

# Die Bedeutung des Renin-Angiotensin-Systems im Tiermodell für Präeklampsie

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Lydia Hering

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin  
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter: 1. Prof. Thomas Börner  
2. Prof. Michael Bader  
3. PD Dr. Ralf Dechend

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2011

**1 Inhaltsverzeichnis**

1	Inhaltsverzeichnis .....	- 2 -
2	Verzeichnisse .....	- 3 -
3	Einleitung.....	- 9 -
4	Material.....	- 37 -
5	Methoden .....	- 43 -
6	Ergebnisse .....	- 66 -
7	Diskussion .....	- 97 -
8	Zusammenfassung .....	- 126 -
9	Literaturverzeichnis .....	- 129 -
10	Danksagung.....	- 141 -
11	Publikationsliste .....	- 143 -
12	Eigenständigkeitserklärung.....	- 145 -

## 2 Verzeichnisse

### 2.1 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1. Entstehung einer Präeklampsie	- 11 -
Abbildung 2. Plazenta, Mensch	- 13 -
Abbildung 3 Gefäßanatomie eines schwangeren Uterus, Mensch	- 13 -
Abbildung 4. Uteroplazentare Einheit, Ratte	- 14 -
Abbildung 5. Schematische Darstellung der Spiralarterien, Mensch	- 16 -
Abbildung 6. Umgebaute Spiralarterie, Ratte	- 17 -
Abbildung 7. Renin-Angiotensin-System	- 25 -
Abbildung 8. Versuchsprotokoll der ANGII + und ANGII ++ Gruppe	- 45 -
Abbildung 9. Transmitterpositionierung im Tier	- 46 -
Abbildung 10. Fötus mit uteroplazentarer Einheit	- 48 -
Abbildung 11. Pipettierschema der quantitativen <i>real time</i> -PCR	- 55 -
Abbildung 12. Schema zur Untersuchung der Spiralarterien	- 60 -
Abbildung 13. Übersicht zu den verwendeten Tiermodellen	- 66 -
Abbildung 14. Angiotensin II im Plasma	- 67 -
Abbildung 15. Uteroplazentares humanes Renin und Angiotensinogen	- 68 -
Abbildung 16. Angiotensin I in der uteroplazentaren Einheit	- 69 -
Abbildung 17. Angiotensin II in der uteroplazentaren Einheit	- 70 -
Abbildung 18. ANGII/ANGI Verhältnis in der uteroplazentaren Einheit	- 71 -
Abbildung 19. Angiotensin 1-7 in der uteroplazentaren Einheit	- 71 -
Abbildung 20. ANG1-7/ANGII Verhältnis in der uteroplazentaren Einheit	- 72 -
Abbildung 21. Mittlerer arterieller Blutdruck	- 74 -
Abbildung 22. Albuminurie	- 75 -
Abbildung 23. <i>NGAL</i> Expression in der Niere	- 75 -
Abbildung 24. Elektronenmikroskopie der Niere	- 76 -
Abbildung 25. Herz- und Körpergewicht unter dem Schwangerschaftseinfluss	- 77 -
Abbildung 26. Herzgewicht der Mutter	- 77 -
Abbildung 27. <i>ANP</i> Expression im Herz	- 78 -
Abbildung 28. <i>BNP</i> Expression im Herz	- 79 -
Abbildung 29. <i>Sirius red</i> Färbung Herz	- 80 -
Abbildung 30. Kollagen 1 Expression im Herz	- 81 -
Abbildung 31. <i>CTGF</i> Expression im Herz	- 82 -

Abbildung 32. Fibronektin Expression im Herz	- 83 -
Abbildung 33. Analyse der Spiralarterien im gesamten mesometrialen Dreieck	- 85 -
Abbildung 34. Tiefe Trophoblasteninvasion in plazentafernen Spiralarterien	- 86 -
Abbildung 35. Gewicht der uteroplazentaren Einheit, fötales Körpergewicht	- 87 -
Abbildung 36. <i>IUGR</i> d21	- 88 -
Abbildung 37. Fötales Herzgewicht	- 89 -
Abbildung 38. <i>ANP</i> und <i>BNP</i> Expression im fötalen Herz	- 89 -
Abbildung 39. Fibrosemarker im fötalen Herz	- 90 -
Abbildung 40. Mobilität SGHPL4	- 91 -
Abbildung 41. Migration <i>explant</i> -Kultur	- 92 -
Abbildung 42. Migrationsassay	- 92 -
Abbildung 43. Invasion SGHPL4	- 93 -
Abbildung 44. Invasionsassay	- 93 -
Abbildung 45. Apoptose SGHPL4	- 94 -
Abbildung 46. Apoptoseassay $\text{TNF}\alpha$ , ActD	- 94 -
Abbildung 47. Apoptoseassay $\text{TNF}\alpha$	- 95 -
Abbildung 48. Ki-67 in <i>explant</i> -Kulturen der Plazenta	- 95 -
Abbildung 49. Aktivierte Caspase 3 in <i>explant</i> -Kulturen der Plazenta	- 96 -



## 2.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Pipettierschema cDNA Synthese	- 53 -
Tabelle 2. PCR Bedingungen cDNA Synthese	- 53 -
Tabelle 3. Primer- und Sondensequenzen	- 54 -
Tabelle 4. Quantitative <i>real time</i> -PCR Bedingungen	- 55 -
Tabelle 5. Protokoll für die Färbung der uteroplazentaren Einheit	- 59 -
Tabelle 6. ANGII in Plasma und uteroplazentarer Einheit	- 73 -
Tabelle 7. Anzahl der Föten und Resorptionen	- 87 -
Tabelle 8. Zusammenfassung ausgewählter Ergebnisse	- 99 -

## 2.3 Abkürzungsverzeichnis

Englisch- und lateinsprachige Ausdrücke sind *kursiv* geschrieben.

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Desoxyadenosintriphosphat
Abb.	Abbildung
ACE	<i>angiotensin-converting-enzyme</i>
AGT	Angiotensinogen
ANG1-7	Angiotensin 1-7
ANGI	Angiotensin I
ANGII	Angiotensin II
ANGII +	Angiotensin II Gruppe (435 ng/kg/min)
ANGII ++	Angiotensin II Gruppe (1 µg/kg/min)
ANP	<i>atrial natriuretic peptide</i>
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex
AT1AA	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor aktivierende Autoantikörper
AT1-R, AT2-R	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor, Angiotensin II Typ 2 Rezeptor
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BK B2-Rezeptor	Bradykinin Typ 2 Rezeptor
BNP	<i>brain natriuretic peptide</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
C	Desoxycytosintriphosphat
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
CD	Differenzierungskluster
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
d	Tag, Schwangerschaftstag
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>

<b>DMSO</b>	<b>Dimethylsulfoxid</b>
<b>DNA</b>	<b>Desoxyribonukleinsäure</b>
<b>DNase</b>	<b>Desoxyribonuklease</b>
<b>dNTP</b>	<b>Desoxynukleosidtriphosphate</b>
<b>dTGR</b>	<b>doppelt transgene Ratte</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ethylendiamintetraessigsäure</b>
<b>EGF</b>	<i>epidermal growth factor</i>
<b>ELISA</b>	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>EM</b>	<b>Elektronenmikroskopie</b>
<b>FAM</b>	<b>6-Carboxy-Fluoreszein</b>
<b>FCS</b>	<i>fetal calf serum</i>
<b>g</b>	<b>Erdbeschleunigung (9,81 m/s<sup>2</sup>)/Gramm</b>
<b>G</b>	<b>Desoxyguanosintriphosphat</b>
<b>h</b>	<b>Stunde, human</b>
<b>hAGT</b>	<b>humanes Angiotensinogen</b>
<b>HCl</b>	<b>Salzsäure</b>
<b>Hepes</b>	<b>2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</b>
<b>HFBA</b>	<b>Heptafluorbuttersäureanhydrid</b>
<b>HLA</b>	<b>humanes Leukozytenantigen</b>
<b>hREN</b>	<b>humanes Renin</b>
<b>Ig</b>	<b>Immunoglobulin</b>
<b>IUGR</b>	<i>intrauterine growth restriction</i>
<b>kDa</b>	<b>Kilodalton</b>
<b>l</b>	<b>Liter</b>
<b>M</b>	<b>Molar</b>
<b>mg</b>	<b>Milligramm</b>
<b>MHC</b>	<b>Haupthistokompatibilitätskomplex</b>
<b>min</b>	<b>Minute</b>
<b>ml</b>	<b>Milliliter</b>
<b>mm</b>	<b>Millimeter</b>
<b>mM</b>	<b>Millimolar</b>
<b>mmHg</b>	<b>Millimeter-Quecksilbersäule</b>
<b>MMP</b>	<b>Matrix-Metalloprotease</b>
<b>mRNA</b>	<b>Boten-RNA</b>
<b>NBT</b>	<b>Nitroblau-Tetrazoliumchlorid</b>
<b>ng</b>	<b>Nanogramm</b>
<b>NGAL</b>	<i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>

<b>nm</b>	<b>Nanometer</b>
<b>PAI</b>	<i>plasminogen activator inhibitor</i>
<b>PAS</b>	<i>perjodic acid-schiff</i>
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	<b>Polymerasekettenreaktion</b>
<b>PE-</b>	<b>Präeklampsie negativ Gruppe</b>
<b>PE+</b>	<b>Präeklampsie positiv Gruppe</b>
<b>pH Wert</b>	<b>negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität, <i>pondus Hydrogenii</i></b>
<b>PL4</b>	<b>SGHPL4 Zelllinie</b>
<b>PLGF</b>	<i>placental growth factor</i>
<b>r</b>	<b>Ratte</b>
<b>RAS</b>	<b>Renin-Angiotensin-System</b>
<b>REN</b>	<b>Renin</b>
<b>RIA</b>	<b>radioaktiver Immunoassay</b>
<b>RNA</b>	<b>Ribonukleinsäure</b>
<b>RNase</b>	<b>Ribonuklease</b>
<b>rpm</b>	<i>revolutions per minute</i>
<b>RT</b>	<b>Raumtemperatur</b>
<b>RUPP</b>	<i>reduced uterine perfusion pressure</i>
<b>s</b>	<b>Sekunde</b>
<b>s.</b>	<b>siehe</b>
<b>SD</b>	<i>Sprague-Dawley</i>
<b>sFLT-1</b>	<i>soluble fms-like tyrosine kinase-1</i>
<b>SGA</b>	<i>small for gestational age</i>
<b>SV</b>	<i>simian virus</i>
<b>T</b>	<b>Desoxythymidintriphosphat</b>
<b>Tab.</b>	<b>Tabelle</b>
<b>TAMRA</b>	<b>6-Carboxy-tetramethyl-Rhodamin</b>
<b>TBS</b>	<i>tris buffered saline</i>
<b>TGR</b>	<b>transgene Ratte</b>
<b>TIMP</b>	<i>tissue inhibitor of matrix metalloproteases</i>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>Tumornekrosefaktor alpha</b>
<b>Tris</b>	<b>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</b>
<b>U</b>	<i>unit</i>
<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>Vol.</b>	<b>Volumen</b>
<b>WT</b>	<b>Wildtyp Gruppe</b>

### 3 Einleitung

#### 3.1 Präeklampsie

Die Schwangerschaftserkrankung Präeklampsie wurde erstmalig 2.000 vor Christus im alten Ägypten beschrieben<sup>1</sup> und manifestiert sich durch plötzlichen Blutdruckanstieg und Proteinausscheidung im Urin. Besonders schwere Verlaufsformen werden von mütterlichen Krampfanfällen (Eklampsie), Auffälligkeiten des Gerinnungssystems (*HELLP* Syndrom mit Hämolyse, erhöhten Leberenzymwerten, Thrombozytenabfall) oder niedrigem fötalen Geburtsgewicht begleitet.<sup>2</sup> Präeklampsie wird durch folgende Kriterien eindeutig charakterisiert und von anderen schwangerschaftsbegleitenden Bluthochdruckerkrankungen, wie Schwangerschaftshochdruck, chronischer Bluthochdruck und Pfropfgestose unterschieden: Der Blutdruck einer im Vorfeld nicht an Bluthochdruck leidenden Patientin ist im letzten Drittel der Schwangerschaft mit >140/90 mmHg definiert; die Proteinurie ist mit >300 mg/l Protein im 24 Stunden Sammelurin angegeben.<sup>3</sup> Die Auswirkungen für die Schwangere und den Fötus sind massiv.<sup>4</sup> So ist Präeklampsie eine Hauptursache für mütterliche Morbidität und Mortalität sowie die Hauptursache für kindliche Frühgeburtlichkeit und Morbidität.<sup>5</sup>

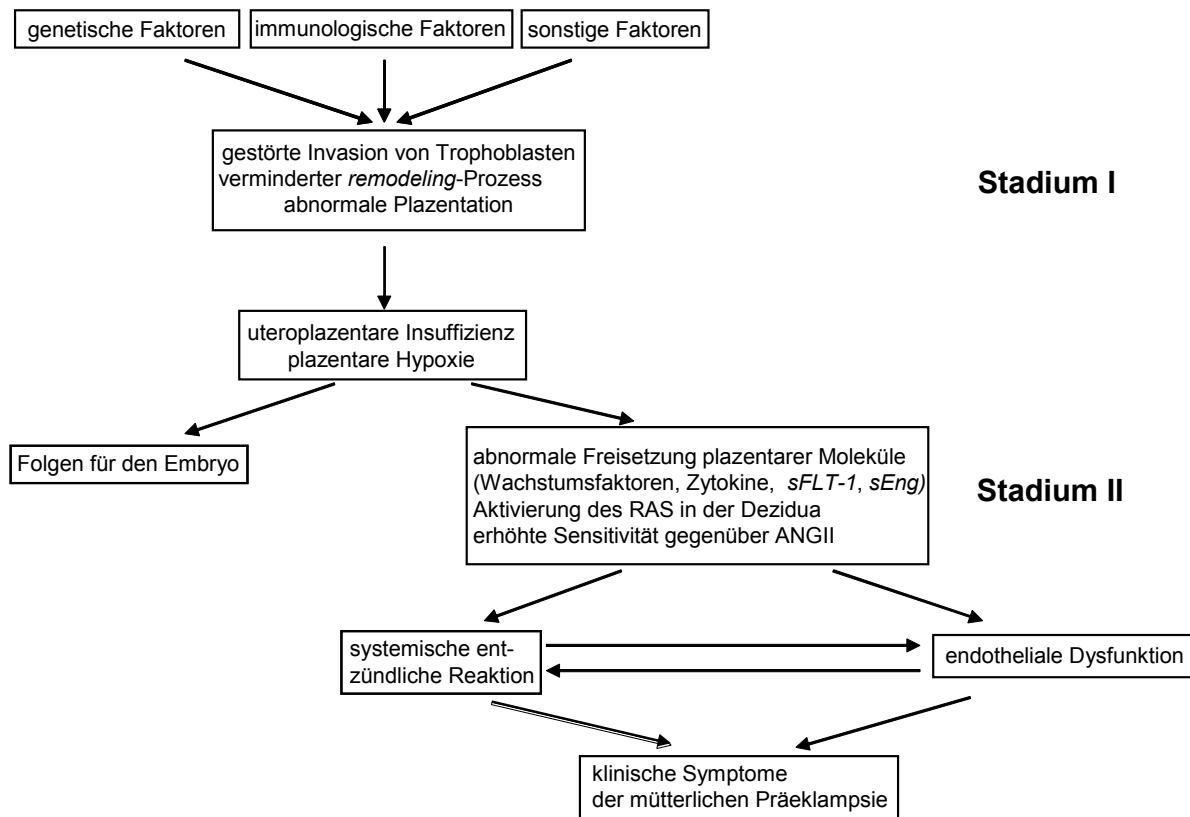
5-10% aller Schwangerschaften weltweit entwickeln eine Präeklampsie, wobei die Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit regional von 2-5% in Europa und den USA bis maximal 19% in Entwicklungsländern variieren.<sup>6</sup> Besteht bereits vor der Schwangerschaft ein Bluthochdruck, so liegt die Wahrscheinlichkeit der Manifestation einer so genannten Pfropfgestose bei 25%, wobei das Risiko umso höher ist, je ausgeprägter der Schweregrad der Hypertonie ist.<sup>7</sup>

Risikofaktoren für die Entwicklung einer Präeklampsie sind mütterliche Vorerkrankungen wie Fettleibigkeit, Diabetes mellitus, erhöhte Insulinresistenz oder chronischer Bluthochdruck.<sup>8</sup> Es wird angenommen, dass Präeklampsie unter anderem infolge einer mütterlichen Immunantwort auf fremdes fötales Antigen, welches dem väterlichen Sperma entstammt, entsteht. Die Immunantwort kann durch verlängerte Exposition gegenüber väterlichem Sperma reduziert werden. So nimmt die Häufigkeit einer Präeklampsie mit jeder folgenden Schwangerschaft ab, was auf eine immunologische Komponente der Erkrankung hinweist. Dieser relative Schutz geht verloren, wenn die Kinder von unterschiedlichen Vätern gezeugt werden.<sup>9</sup> Ein

geringeres Risiko für Präeklampsie weisen die Frauen auf, die längere Zeit vor Schwangerschaftsbeginn sexuellen Kontakt zum Vater hatten.<sup>10</sup> Indem die Mutter die Plazenta als temporäres Selbst erkennt, werden Abstoßungsreaktionen verhindert. Mechanistisch geschieht dies einerseits durch die in Trophoblasten fehlende Expression von humanem Leukozytenantigen- (HLA) A und HLA-B sowie Klasse II Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC), wodurch die Plazenta vor dem Immunsystem versteckt wird. Andererseits wird eine einzigartige Kombination von HLA-C, HLA-G und HLA-E MHC Molekülen auf Trophoblasten exprimiert, die einen Angriff des Immunsystems aktiv verhindern können.<sup>11</sup> Auch genetische Faktoren scheinen eine Rolle zu spielen: So haben Töchter und Schwestern von präeklampsischen Frauen ein 30%iges Risiko, selbst an Präeklampsie zu erkranken.<sup>12</sup> Frauen, die Nachkommen mit einer Trisomie 13 austragen, haben ein signifikant höheres Risiko, Präeklampsie zu entwickeln,<sup>13</sup> wobei von besonderem Interesse ist, dass das Gen für *soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFLT-1)* auf diesem Chromosom lokalisiert ist<sup>14</sup> und *sFLT-1* in präeklampsischen Plazenten vermehrt exprimiert wird.<sup>15</sup>

Präeklampsie ist an die Anwesenheit einer Plazenta gebunden und ihre Symptome klingen nach der Geburt rasch ab. In Abbildung 1 sind die Stadien der Präeklampsieentstehung dargestellt, wobei sich Stadium I auf die Plazenta beschränkt und im ersten Trimester erreicht wird, während Stadium II in den letzten beiden Trimestern der Schwangerschaft erreicht wird und als Translation des ersten Stadiums auf das gesamte mütterliche System verstanden wird.<sup>16</sup> Um ein ausreichendes Nährstoffangebot für das Ungeborene zur Verfügung zu stellen, müssen die die Plazenta versorgenden mütterlichen Arterien weitgestellt werden. Dieser als *remodeling*-Prozess bezeichnete Vorgang an den Spiralarterien wird durch aus der Plazenta einwandernde Trophoblasten gewährleistet. Maßgeblich an der Entstehung einer Präeklampsie beteiligt sind ein verminderter *remodeling*-Prozess und die damit verbundene plazentare Hypoxie.<sup>17</sup> Eine hypoxische und dysfunktionale Plazenta sezerniert verstärkt Substanzen in den mütterlichen Blutstrom, die zu einer generalisierten Endothelzellstörung führen. Dazu gehören unter anderem *sFLT-1*,<sup>15</sup> ein löslicher Rezeptor des *vascular endothelial growth factor (VEGF)*, Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies, Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems und der den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor aktivierende Autoantikörper (AT1AA).<sup>18</sup>

Bluthochdruck und Endorganschäden manifestieren sich, wenn das mütterliche System diesen Veränderungen nicht gewachsen ist.<sup>19</sup>



**Abbildung 1. Entstehung einer Präeklampsie**

Aufgrund genetischer, immunologischer und weiterer Risikofaktoren kommt es zu verminderter Invasion extravillöser Trophoblasten und verringertem *remodeling*-Prozess an den Spiralarterien. Die daraus resultierende uteroplazentare Insuffizienz (Stadium I der Präeklampsie) führt zu einem veränderten Expressionsmuster der Plazenta, wodurch sich eine systemische endotheliale Dysfunktion manifestiert und eine systemische entzündliche Reaktion ausgelöst wird (Stadium II). Daraus resultieren letztendlich die klinischen Symptome einer Präeklampsie.<sup>19, 20</sup>

Die zuverlässigste Behandlung einer Präeklampsie ist die Geburt, wobei das Risiko für die Mutter durch die Erkrankung gegen das Risiko für das Kind durch die Frühgeburtlichkeit genau abgewogen werden muss. Entscheidend sind die Verhinderung von Krampfanfällen, die Stabilisierung des Blutdrucks zur Vermeidung von Endorganschäden und die Verlängerung der Schwangerschaft.<sup>21</sup> Generell gestaltet sich die Behandlung sehr schwierig, da die Pathogenese multifaktoriell ist und weit vor Manifestation der Symptome erfolgt. Zudem gestaltet sich die Einstellung des Blutdrucks schwierig, da viele Blutdruckmedikamente embryotoxisch sind und der Zielblutdruck einer Schwangeren aktuell diskutiert wird.<sup>21</sup>

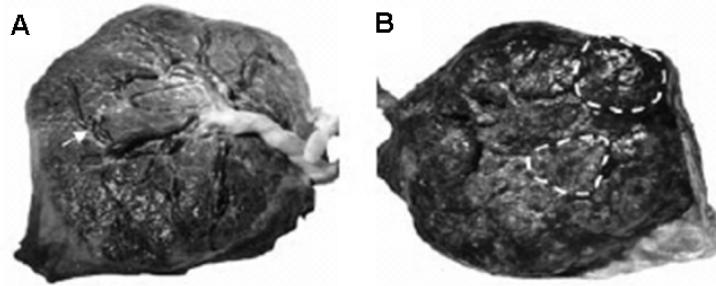
### 3.1.1 Uteroplazentare Einheit

Die Plazenta ist das für die Pathogenese einer Präeklampsie ausschlaggebende Organ. Nach Entfernung der Plazenta normalisieren sich Blutdruck und Proteinurie rasch.<sup>22</sup> Die Plazenta stellt eine Filtermembran dar, die mütterliches und fötales Blut voneinander trennt, aber einen gegenseitigen physiologischen Austausch ermöglicht. Weitere Funktionen der Plazenta sind die Synthese von Hormonen, wie Östrogen und Progesteron, der unvollständige Schutz des Fötus vor Medikamenten und infektiösen Agentien, die von der Plazentaschranke zurückgehalten werden und die aktive Aufnahme ausgesuchter Proteine wie Transferrin und Immunoglobulin (Ig) G.

Die Plazenta entsteht aus fötalen Zellen, den Trophoblasten und aus der mütterlichen Gebärmutterschleimhaut. Bereits im Stadium der Blastozyste wird zwischen Embryoblast und dem umhüllenden Trophoblast unterschieden. Dort, wo mononukleäre Trophoblasten der Blastozyste mit dem Uterusepithel in Kontakt kommen, fusionieren sie zum invasiven, mehrkernigen Synzytiotrophoblast, während die zurückgebliebenen Trophoblasten als Zytotrophoblast bezeichnet werden und als proliferative Stammzellen der Plazentaentwicklung dienen. Zwischen dem Synzytiotrophoblast entstehen flüssigkeitsgefüllte Zwischenräume, sodass nun zwischen intervillösem Raum und Plazentazotten (*villous tree*) unterschieden werden kann. Mit Einnistung der Blastozyste wird das mütterliche Endometrium in Deziduagewebe umgewandelt, welches durch vergrößerte, fett- und glykogenspeichernde Zellen gekennzeichnet ist. Der Synzytiotrophoblast wandert weiter in die Dezidua ein und eröffnet mütterliche Gefäße, sodass sich mütterliches Blut in den intervillösen Raum ergießt. Extraembryonale mesodermale Zellen der fötalen Seite der Plazenta wandern in die Plazentazotten ein; hämatopoetische Vorläuferzellen entwickeln sich und vaskularisieren diese.<sup>23</sup>

Die menschliche Plazenta ist ein rundes, diskoidales Organ. Sie ist im ausgereiften Zustand im Durchschnitt 470 g schwer und im Durchmesser 22 cm groß. Die fötale Seite der Plazenta wird von der Chorionplatte repräsentiert, auf die die Nabelschnur mit der Nabelvene und der paarigen Nabelarterie trifft. Die Basalplatte der Plazenta ist der mütterlichen Dezidua zugewandt. Sie ist eine künstliche Fläche die während der Ablösung der Plazenta bei der Geburt entsteht und aus fötalen, extravillösen Trophoblasten und mütterlichen Zellen der Dezidua besteht (s. Abb. 2).<sup>23</sup>

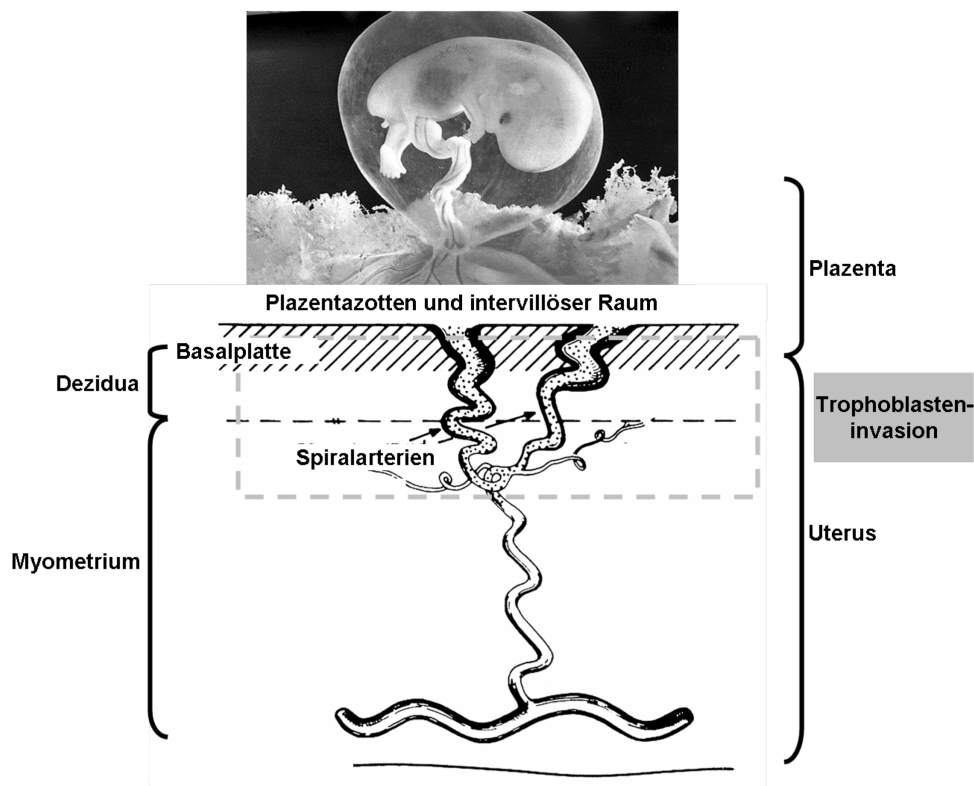




## Abbildung 2. Plazenta, Mensch

Fötale Seite einer humanen Plazenta mit Chorionplatte und Nabelschnur (A) beziehungsweise mütterliche Seite mit Basalplatte (B).<sup>24</sup>

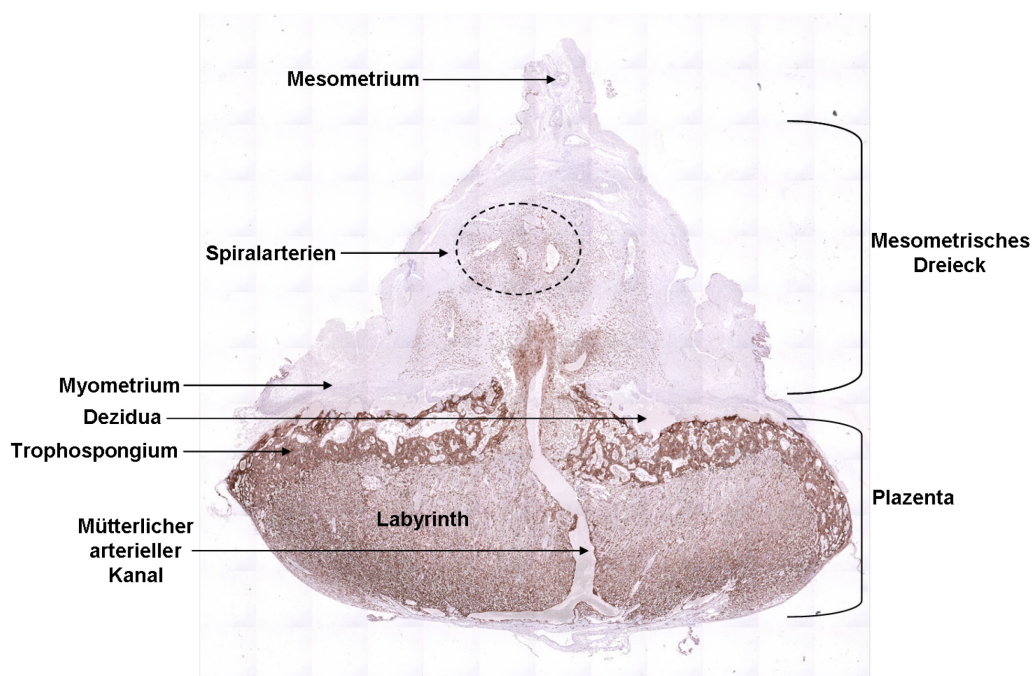
Die Gefäße der Nabelschnur verzweigen sich im Bereich der Chorionplatte und erhalten Anschluss an die Gefäße der Plazentazotten. Die Plazentazotten werden vom Blut mütterlicher Gefäße im intervillösen Raum umspült, wobei mütterliches Blut exklusiv von Spiralarterien zugeführt wird (s. Abb. 3). Über die Plazentaschranke, bestehend aus Synzytiotrophoblast, Zytotrophoblast, Zottenbindegewebe und Kapillarendothel fötaler Gefäße, hinweg werden Sauerstoff und Nährstoffe in die Venen der Plazentazotten aufgenommen beziehungsweise Kohlendioxid und metabolische Endprodukte aus den Arterien der Plazentazotten freigesetzt.<sup>23</sup>



### Abbildung 3 Gefäßanatomie eines schwangeren Uterus, Mensch

Nährstoffe und Sauerstoff werden über mütterliche Spiralarterien im Bereich der Dezidua in die Plazenta geschwemmt, über die Plazentaschranke hinweg in die Nabelvene aufgenommen und dem Fötus zugänglich gemacht. Für die optimale Versorgung des Fötus ist eine Weitstellung der Spiralarterien im Verlauf der Schwangerschaft erforderlich, die durch aus der Plazenta einwandernde Trophoblasten vermittelt werden kann.<sup>25</sup>

Die im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit untersuchten Fragestellungen wurden im Rattenmodell erarbeitet, deren uteroplazentare Einheit sich im Aufbau grundlegend von einer humanen Plazenta unterscheidet. Abbildung 4 zeigt einen Querschnitt der uteroplazentaren Einheit einer Ratte mit Plazenta, Dezidua, einer dünnen Schicht Myometrium und dem mesometrialen Dreieck. Die Plazenta besteht aus dem Labyrinth, in welchem die Masse an Trophoblasten sitzt und in welchem der Stoffaustausch zwischen fötalem und mütterlichem Blut erfolgt, sowie aus dem Trophospongium mit hormonsynthetisierenden Trophoblastenriesenzellen. Die Dezidua der Ratte entspricht dem Teil der menschlichen Dezidua, der in direktem Kontakt zum Trophoblast steht. Auffälligste Struktur der uteroplazentaren Einheit der Ratte ist das mesometriale Dreieck. Es bildet sich während der Schwangerschaft als Ausläufer der Dezidua zwischen den Schichten des Myometriums aus und besteht aus Zellen der Dezidua, natürlichen Killerzellen des Uterus, eingewanderten Trophoblasten und Blutgefäßen. Bei den Blutgefäßen kann zwischen kleinen Arteriolen, größeren Venen und 2-3 Spiralarterien pro mesometrialem Dreieck unterschieden werden. Spiralarterien sind mehrfach gewundene Arteriolen, die sich direkt in den mütterlichen arteriellen Kanal der Plazenta ergießen und damit Plazenta und Fötus versorgen.<sup>26, 27</sup>



**Abbildung 4. Uteroplazentare Einheit, Ratte**

Uteroplazentare Einheit der Ratte am 18. Schwangerschaftstag, bestehend aus dem mesometrialen Dreieck und der Plazenta, immunhistochemisch gefärbt gegen den Trophoblastenmarker Cytokeratin.<sup>26</sup>

### 3.1.2 Remodeling-Prozess

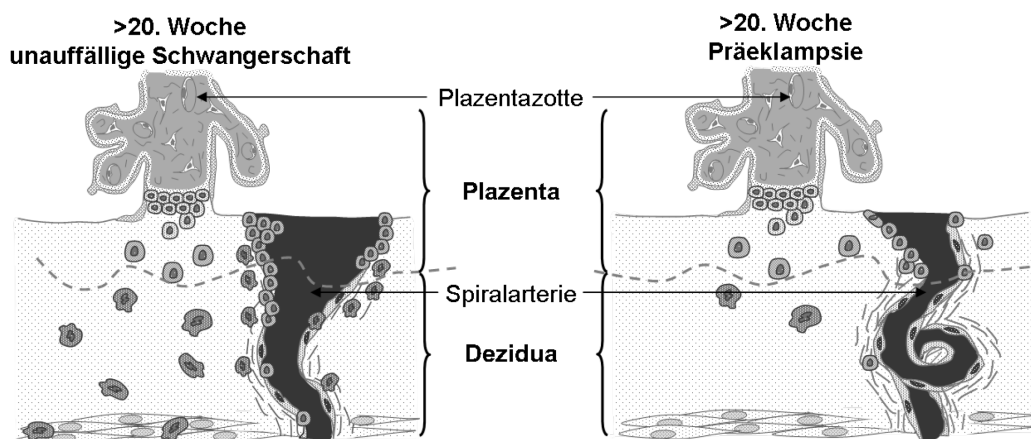
Mit fortschreitender Entwicklung des Fötus steigt auch dessen Nährstoffverbrauch, sodass die Spiralarterien immer größere Mengen Blut in den intervillösen Raum freisetzen müssen. Dieser Anforderung sind die Spiralarterien nur gewachsen, wenn sie im Laufe der Plazentation in dilatierte Gefäße umgewandelt werden, die auf vasokonstriktische Stimuli nicht reagieren, große Blutvolumina fassen können und dem mütterlichen Blutfluss geringen Widerstand entgegensetzen.<sup>5, 22</sup>

Die Entstehung der Dezidua geht einher mit Veränderungen im Aufbau der Spiralarterien.<sup>28</sup> Verantwortlich für diesen *remodeling*-Prozess sind invasive, extravillöse Trophoblasten, die aus Zytotrophoblasten hervorgehen, sobald diese den Kontakt zur Basalmembran verlieren.<sup>23</sup> Invasive, extravillöse Trophoblasten wandern zwischen der 6. und 12. sowie zwischen der 14. und 18. Schwangerschaftswoche<sup>20</sup> in die mütterliche Dezidua und das innere Myometrium ein.<sup>26</sup> Dabei wandern sie einerseits vom Sauerstoffgehalt geleitet als endovaskuläre Trophoblasten in Spiralarterien ein, wo sie sich entgegen dem Blutstrom gerichtet per Migration fortbewegen und andererseits als interstitielle Trophoblasten in Gewebe ein. Eingewanderte Trophoblasten interagieren mit der Gefäßwand der Spiralarterien: Zuerst werden die äußeren Lagen der glatten Gefäßmuskelzellen der Spiralarterienwand durcheinander gebracht, das Endothel wird aufgelöst und durch in die Gefäßwand eingebettete intramurale Trophoblasten ersetzt, die nun endothelzellspezifische Faktoren (Adhäsionsmoleküle, angiogene Faktoren) exprimieren. Durch den Einbau von Trophoblasten werden die verbliebenen glatten Gefäßmuskelzellen zerstört und die Spiralarterien weitgestellt. Als Barriere zwischen mütterlichem Blut im Lumen der Spiralarterien und den im Lumen der Spiralarterien verbliebenen intraluminalen Trophoblasten synthetisieren letztgenannte Fibrinoid. Um die 20. Schwangerschaftswoche ist der *remodeling*-Prozess beendet und die dilatierten Spiralarterien können die wachsenden intervillösen Räume mit ausreichend Blut versorgen (s. Abb. 5).<sup>29</sup>

Untersuchungen von Dezidua und innerem Myometrium einer an Präeklampsie leidenden Schwangeren ergaben ein vermehrtes Auftreten von Atheros, gekennzeichnet durch Thrombose, Nekrose und Schaumzellen<sup>30</sup> sowie eine veränderte Invasion von Trophoblasten. So wurden deutlich weniger Trophoblasten nachgewiesen, die Invasion beschränkte sich auf die Dezidua und allenfalls plazentanahe Bereich des Myometriums und die Spiralarterien waren unverändert

hinsichtlich ihrer Weitstellung,<sup>5, 22</sup> sodass die unterversorgte Plazenta in den Zustand einer Hypoxie gerät (s. Abb. 5).<sup>31</sup>

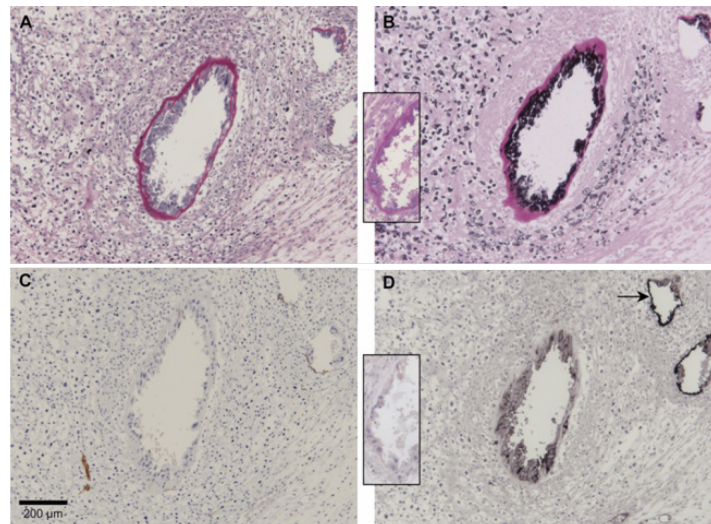
Die in der Literatur diskutierten Gründe für die verminderte Trophoblasteninvasion und den ausbleibenden *remodeling*-Prozess sind mannigfaltig und reichen von defekten Trophoblasten, deren Expression von Adhäsionsmolekülen oder Proteasen verändert ist, über die Blockierung der Invasion durch regulatorische Moleküle oder Schwankungen im Sauerstoffgehalt bis zur Elimination eingewanderter Trophoblasten durch akute Atherose oder mütterliche Immunprozesse.<sup>29, 30</sup>



**Abbildung 5. Schematische Darstellung der Spiralarterien, Mensch**

Um die 20. Schwangerschaftswoche ist der *remodeling*-Prozess an den Spiralarterien abgeschlossen. Bei einer unauffälligen Schwangerschaft sind viele Trophoblasten sowohl tief im mütterlichen Gewebe als auch in der Spiralarterie nachweisbar und die Spiralarterien sind dilatiert, sodass der Blutfluss zur Plazenta erhöht ist. Während einer präeklampsischen Schwangerschaft bleiben die Spiralarterien verengt, die Trophoblasteninvasion ist vermindert hinsichtlich der Anzahl eingewanderter Zellen und der Invasionstiefe.<sup>32</sup>

Bei der schwangeren Ratte werden die Spiralarterien im mesometrialen Dreieck ebenfalls während des *remodeling*-Prozesses weitgestellt. Die daran beteiligten interstitiellen und endovaskulären Trophoblasten wandern aus dem Labyrinth in die Dezidua und darüber hinausgehend tief in das mesometriale Dreieck hinein.<sup>26, 27</sup> Abbildung 6 zeigt Serienschnitte einer vollständig umgebauten Spiralarterie in Ratten, die während der Schwangerschaft Bluthochdruck und Proteinurie entwickeln. Entgegen der Situation bei menschlichen Schwangeren, die unter Präeklampsie leiden, sind im Vergleich zu Kontrolltieren Trophoblasteninvasion und *remodeling*-Prozess nicht reduziert.<sup>33</sup>



**Abbildung 6. Umgebaute Spiralarterie, Ratte**

Serienschnitte einer vollständig von Trophoblasteninvasion betroffenen Spiralarterie im Rattenmodell für Präeklampsie am 18. Tag der Schwangerschaft, gefärbt mit der *periodic acid-schiff* (PAS) Technik (A), für Cytokeratin (B),  $\alpha$ -Aktin (C) und CD 31 (D). A zeigt die von Trophoblasten abhängige Einlagerung von Fibrinoid in die Spiralarterienwand. Die Schicht der  $\alpha$ -Aktin positiven glatten Gefäßmuskelzellen in der Spiralarterienwand war zerstört (C), das CD 31 positive Endothel (D) wurde durch Cytokeratin positive Trophoblasten ersetzt (B), wobei der Pfeil auf nur teilweise von Invasion betroffene Arterien verweist, um den Unterschied zwischen stark angefärbten CD 31 positiven Endothelzellen in benachbarten Arterien und den ebenfalls auf CD 31 ansprechenden Trophoblasten in der Spiralarterienwand zu verdeutlichen (D). Die Rechtecke in B und D repräsentieren nur mit dem zweiten Antikörper behandelte parallele Kontrollschnitte.<sup>33</sup>

### 3.1.3 Herz-Kreislauf-System

Die normale Schwangerschaft ist mit ausgeprägten funktionalen Veränderungen des Herz-Kreislauf-Systems verbunden, um den Ansprüchen der Schwangerschaft gerecht zu werden. So sinkt der Blutdruck stufenweise bis zu seinem Minimum in der 22. Schwangerschaftswoche ab, um dann zum Ende der Schwangerschaft wieder anzusteigen. Eine generalisierte Vasodilatation entwickelt sich bereits während der Lutealphase und der periphere vaskuläre Widerstand sinkt ab der 5. Schwangerschaftswoche, bis er in der 20. Schwangerschaftswoche 34% niedriger ist als vor Eintreten der Schwangerschaft. Als Resultat dieser Gefäßweitstellung ist der periphere Blutfluss erhöht; primär betroffen sind Haut, Niere und uteroplazentare Einheit.<sup>34</sup> Weiterhin werden Kompensationsmechanismen wie gesteigertes Schlagvolumen, gesteigertes Plasmavolumen, renale Hyperfiltration und Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems initiiert.<sup>35</sup>

Bei Präeklampsie ist die hämodynamische und vaskuläre Adaptation während der Schwangerschaft gestört. Verglichen mit normalen Schwangerschaften ist der periphere Gefäßwiderstand erhöht und die Gefäße sind verengt, sodass der

Blutdruck ansteigt. Auch das Plasmavolumen ist im Vergleich mit normalen Schwangerschaften erniedrigt.<sup>36</sup>

Eine Schwangerschaft ist mit hämodynamischen und hormonellen Veränderungen assoziiert, die auch das Herz beeinflussen. Durch reversible, physiologische Herzhypertrophie während der normalen Schwangerschaft wird die erhöhte Volumenbelastung mittels Vergrößerung der Herzkammern und Verdickung der Herzwände kompensiert, wodurch die Pumpkapazität verbessert wird, sodass das Herz effizienter arbeiten kann. Die physiologische Herzhypertrophie während der Schwangerschaft ist nicht von einer Überexpression des *atrial natriuretic peptide* (*ANP*) und *brain natriuretic peptide* (*BNP*) begleitet.<sup>37</sup>

Bei Präeklampsie kommt es zu einer pathologischen Herzhypertrophie, ausgelöst durch eine Druckbelastung des Herzens, die durch verdickte Herzkammerwände charakterisiert ist, ohne dass es zu einer Vergrößerung der Herzkammern kommt.<sup>38</sup> Die Entstehung einer pathologischen Herzhypertrophie wird begleitet von der vermehrten Expression von *ANP* und *BNP*, deren Wirkung in der Reduktion der Druck- und Volumenbelastung liegt.<sup>37</sup> Zudem wirken *ANP* und *BNP* einer Hypertrophierung entgegen, indem sie das Wachstum von Fibroblasten und die Vergrößerung der Myozyten hemmen.<sup>39</sup>

Die extrazelluläre Matrix im Myokard wird hauptsächlich von Fibroblasten synthetisiert und ist hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Masse sehr variabel. Sie besteht hauptsächlich aus Kollagenen und Glykoproteinen, zu letzteren gehören auch Fibronectin und Elastin. Die extrazelluläre Matrix bildet die Struktur, in die Myozyten und Kapillarnetz eingebettet sind und reguliert diverse Prozesse wie Zellwachstum, Zelladhäsion, Zellmigration und Wundheilung. Neben einer Vergrößerung der Myozyten geht die pathologische Herzhypertrophie mit einer Proliferation von Fibroblasten einher, sodass es zur Fibrosierung des Herzens durch vermehrte Ablagerung von Fibronectin und Kollagenen kommt.<sup>40</sup> Folgen der Fibrosierung sind eine Versteifung der Herzkompartimente und die damit verbundene Einschränkung der Pumpfunktion<sup>41</sup> sowie Erregungsleitungsstörungen.<sup>42</sup> *Connective tissue growth factor* (*CTGF*) ist ein pro-fibrotisch wirkendes Protein, welches unter anderem von Fibroblasten, glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen synthetisiert wird und in die Regulation von Zellproliferation, Zellapoptose und Zellmigration sowie die Bildung der extrazellulären Matrix involviert ist.<sup>43</sup>

Die während der unauffälligen Schwangerschaft beobachteten Veränderungen am Herz-Kreislauf-System sind vollständig reversibel, während die darüber hinausgehenden Veränderungen während der präeklampsischen Schwangerschaft nach Beendigung der Schwangerschaft lediglich reduziert sind.<sup>44</sup> So ist das relative Risiko für die Entstehung von Hypertonie oder ischämischen Herzerkrankungen bei Frauen erhöht, die vormals an Präeklampsie litten.<sup>2</sup> In Schottland wurde dazu eine retrospektive Kohortenstudie durchgeführt, die zeigen konnte, dass das mütterliche Risiko für ischämische Herzerkrankungen nach Präeklampsie signifikant erhöht war. Zudem stieg das mütterliche Risiko weiter an, wenn die Schwangere nicht nur an Präeklampsie litt sondern zusätzlich ein Baby gebar, dessen Geburtsgewicht unterhalb des niedrigsten Fünftel für das Gestationsalter lag.<sup>45</sup> Zu beachten ist, dass Präeklampsie und kardiovaskuläre Erkrankungen viele ihrer Risikofaktoren teilen, sodass nicht ersichtlich ist, ob die Präeklampsie an sich oder aber die zugrundeliegenden Risikofaktoren zur erhöhten Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen im späteren Leben führen.<sup>2</sup>

Auch in der Ratte passt sich das Herz-Kreislauf-System an die Schwangerschaft an; dies ist allerdings weniger gut untersucht als beim Mensch. Bekannt ist, dass es zu einer mit erhöhtem Schlagvolumen und erhöhter Kontraktilität verbundenen linksventrikulären Herzhypertrophie kommt, welche das Herz in seiner mechanischen Funktion effizienter macht. Die Expression von *ANP* im linken Ventrikel ist während der Schwangerschaft konstant, während die Expression von *BNP* reduziert ist.<sup>39</sup>

### 3.1.4 Nierenparameter

Bedingt durch eine vaskuläre und interstitielle Volumenzunahme ist die humane Niere während der normalen Schwangerschaft vergrößert; das Nierenbecken ist dilatiert.<sup>46</sup> Aufgrund hormoneller und hämodynamischer Umstellungen während der unauffälligen Schwangerschaft steigen der renale Plasmafluss und die glomeruläre Filtrationsrate um 40-60% während des ersten Trimesters an. Bei Präeklampsie sind beide Parameter um 30% reduziert verglichen mit der normalen Schwangerschaft. Proteinurie (300 mg/d bis 10 g/d<sup>46</sup>) tritt normalerweise zusammen mit dem Bluthochdruck auf, selten leicht verzögert. Zur Entstehung von Albuminurie tragen der Verlust der Größen- und Ladungsselektivität der glomerulären Barriere, bestehend aus gefenstertem Kapillarendothel, Kapillarbasalmembran und den

Podozytenfortsätzen, zwischen denen die Schlitzmembran ausgebildet ist, bei.<sup>47</sup> In seltenen Fällen entwickeln Patienten mit Präeklampsie akutes Nierenversagen.<sup>46</sup>

Die typische histopathologische Veränderung einer präeklampsischen Niere ist die glomeruläre Endotheliose, charakterisiert durch Fibrinablagerung in Endothel- und Mesangiumzellen, Endothelzellschwellung, Verlust von Endothelfenstern und Verringerung des Kapillarlumens.<sup>2, 21</sup> Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen sehen die Podozytenfortsätze unbeschädigt aus, obwohl podozytenspezifische Proteine wie Nephtrin, das am Aufbau der Schlitzmembran beteiligt ist, und Synaptopodin, das als aktinassoziertes Protein am Umbau des Zytoskeletts beteiligt ist, in Schwangerschaften mit schwerer Präeklampsie vermindert exprimiert werden. Weiterhin sind im Urin von Schwangeren, die an Präeklampsie leiden, Podozyten im Urin (Podozyturia) nachweisbar.<sup>21</sup>

*Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)* ist ein Protein, welches im Serum präeklampsischer Schwangeren in allen Trimestern im Vergleich mit unauffälligen Schwangerschaften signifikant erhöht ist und mit Blutdruck und Proteinurie positiv korreliert.<sup>48</sup> Als Antwort auf einen renalen Tubulusschaden steigt die *NGAL* Expression in tubulären Epithelzellen von Mensch und Nagetieren um den Faktor 1000 an und ist frühzeitig in Serum und Urin nachweisbar, sodass es als Biomarker für Nierenschaden genutzt wird.<sup>49</sup> Liganden von *NGAL* sind die kleinen, eisenbindenden Siderophore. Einerseits werden Siderophore von Bakterien produziert, die extrazelluläres Eisen durch Bindung an Siderophore aufnehmen. Indem *NGAL* die Anzahl freier Siderophore reduziert, hat es bakteriostatische Wirkung auf eisenabhängige Bakterien. Andererseits werden Siderophore von eukaryotischen Zellen produziert, die in den *NGAL*-abhängigen Eisentransport involviert sind, der bei Zellprozessen wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung eine schützende Rolle spielt.<sup>50</sup> So führte die Applikation von *NGAL*-Siderophore-Eisen Komplexen in Mäusen, denen anschließend ein ischämischer Nierenschaden gesetzt wurde, zur Verminderung der Nierenschädigung.<sup>49</sup>

Nach Geburt verschwindet die Proteinurie normalerweise innerhalb von 3 bis 8 Wochen, während eine Mikroalbuminurie (30–300 µg/mg<sup>51</sup>) noch 3 bis 5 Jahre nach der Präeklampsie bei 50% der Betroffenen nachweisbar ist.<sup>52</sup> Ausschließlich bei Frauen, die vormals unter Präeklampsie litten, konnte im Rahmen von



Nierenbiopsien glomeruläre Sklerose nachgewiesen werden, während dies in der Kontrollgruppe ohne Präeklampsie-Hintergrund nicht erfolgte.<sup>2</sup>

### 3.1.5 Fötus

Sind Neugeborene leichter als erwartet, muss unterschieden werden zwischen gesunden Neugeborenen, die hinsichtlich ihrer Konstitution für ihr Gestationsalter klein sind (*small for gestational age, SGA*) und denen, deren Wachstum *in utero* eingeschränkt war und die dementsprechend ihr Wachstumspotential nicht erfüllen konnten (*intrauterine growth restriction, IUGR*).<sup>53</sup> SGA bezeichnet alle Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht oder einer Geburtslänge unterhalb der 10. Perzentile für das Gestationsalter.<sup>54</sup> IUGR ist durch asymmetrisches Wachstum gekennzeichnet: Bei Todgeburten wurde ein erhöhtes Verhältnis von Hirngewicht zu Lebergewicht gefunden, das als Marker für IUGR ohne Nutzen ist. Allerdings kann durch Einsatz von Ultraschall ein Abdomenumfang unterhalb der entsprechenden 10. Perzentile bei normalem Kopfumfang diagnostiziert werden.<sup>53</sup> Grundlage ist eine Hierarchie hinsichtlich der Entwicklung und des Wachstums der fötalen Organe: Bei einem unterversorgten Fötus stehen Nieren, Leber und Lungen an unterer Stelle, weil deren Funktionen *in utero* von der Mutter übernommen werden, während wichtigere Organe wie das Gehirn besser versorgt werden.<sup>55</sup>

Bluthochdruck während der Schwangerschaft allein oder aber begleitet von Proteinurie in Form einer Präeklampsie ist einer der wichtigsten Faktoren, die zur Entstehung von IUGR beitragen.<sup>54</sup> Jede dritte Präeklampsie wird von IUGR begleitet, wobei IUGR isoliert in 8-14% der normotensiven Schwangerschaften auftritt.<sup>11</sup> Präeklampsie kann man hinsichtlich des Zeitpunktes der Manifestation ihrer Symptome in *early-onset* und *late-onset* unterteilen, wobei beide Formen sich in einigen Punkten substantiell voneinander unterscheiden: Die vor der 34. Schwangerschaftswoche (*early-onset*) auftretende Präeklampsie betrifft 5-20% aller Präeklampsiefälle, die aber besonders stark ausgeprägt sind, sodass der Fötus von IUGR betroffen ist. Ihre Ursache liegt in dem ausbleibenden Umbau der Spiralarterien und der damit verbundenen Unterversorgung von Plazenta und Fötus. Nach der 34. Schwangerschaftswoche spricht man von *late-onset* Präeklampsie, deren Ursache nicht im Umbau der Spiralarterien zu finden ist, sondern eher in der mütterlichen Konstitution (endotheliale Dysfunktion, metabolisches Syndrom, Immunprozesse) und eventuell Veränderungen im Zottentrophoblast. Daher ist das

Neugeborene meist normal groß gewachsen. In Fällen isolierter *IUGR* wurde ebenfalls eine abnormale Entwicklung der Plazenta mit verminderter Trophoblasteninvasion und ausbleibendem *remodeling*-Prozess nachgewiesen, sodass es ebenfalls zur Unterversorgung von Plazenta und Fötus kommt.<sup>11, 24, 56</sup> So wird diskutiert, ob eine Kombination aus Präeklampsie und *IUGR* für die besonders schwere Ausprägung des Krankheitsgrades verantwortlich ist und die abnormale Plazentation lediglich für die Pathogenese der *IUGR* verantwortlich ist, aber keinen Einfluss auf die Entstehung einer Präeklampsie hat.<sup>24</sup>

Aus evolutionsbiologischer Sicht wird Präeklampsie als Kampf zwischen den unterschiedlichen Bedürfnissen mütterlicher und väterlicher (fötaler) Gene verstanden. Demnach induziert der Fötus einen Anstieg des mütterlichen Blutdrucks, um die Plazenta und damit sich selbst besser versorgt zu wissen, besonders im Falle einer Minderdurchblutung der Plazenta.<sup>8</sup> Daher hilft eine medikamentöse Blutdrucksenkung dem Fötus nicht. So sind mütterlicher Blutdruckabfall und niedriges Geburtsgewicht positiv miteinander korreliert.<sup>57</sup>

SGA Neugeborene sind gesund, ihr Risiko für perinatale Morbidität und Mortalität ist nur leicht erhöht verglichen mit normalgewichtigen Neugeborenen. Neugeborene mit isolierter *IUGR* oder *IUGR* in Kombination mit Präeklampsie haben hingegen ein hohes Risiko für perinatale Mortalität und Morbidität,<sup>58</sup> verminderte kognitive Funktionen<sup>53</sup> und ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen.<sup>2</sup> *IUGR* alleine hat keinen nachweisbaren Einfluss auf die Mutter, außer dass auch Mütter eines *IUGR* Neugeborenen ein erhöhtes Risiko haben, später an ischämischen Herzkrankheiten zu erkranken.<sup>56</sup>

Im Rahmen der von Barker vorgestellten Hypothese der fötalen Programmierung sind Wachstumsrestriktionen *in utero* und spätere Krankheiten miteinander graduell gekoppelt. Dafür kommen folgende Mechanismen in Frage: (1) Die funktionelle Kapazität wichtiger Organe wie Herz oder Niere ist vermindert: Fällt die Unterversorgung des Fötus in die kritische Phase der Nierenentwicklung, so werden weniger Nephrone angelegt, wodurch es zur erhöhten Prädisposition für Albuminurie und Bluthochdruck kommt. (2) Ein unterversorgter Fötus entwickelt einen sparsamen Weg, mit Nährstoffen umzugehen: Zum Beispiel kann Insulinresistenz als persistierende fötale Antwort verstanden werden, die Blutglukosekonzentration zugunsten des Gehirns aufrecht zu erhalten. Knappe Ressourcen werden *in utero* so

verteilt, dass das Gehirn wenn möglich gut versorgt ist, auf Kosten der Entwicklung von Nieren, Leber und Lungen. (3) Es wurde über eine erhöhte Vulnerabilität in einer widrigen Umgebung spekuliert: So wurde eine Assoziation zwischen Armut und koronarer Herzkrankheit gefunden, die bisher nicht erklärt werden konnte.<sup>55</sup>

### 3.2 Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist eine koordinierte Hormon-Enzym-Kaskade. Es ist in die Steuerung der renalen Salz- und Wasserrückgewinnung sowie des Blutdrucksystems involviert und beeinflusst die Expression von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen.

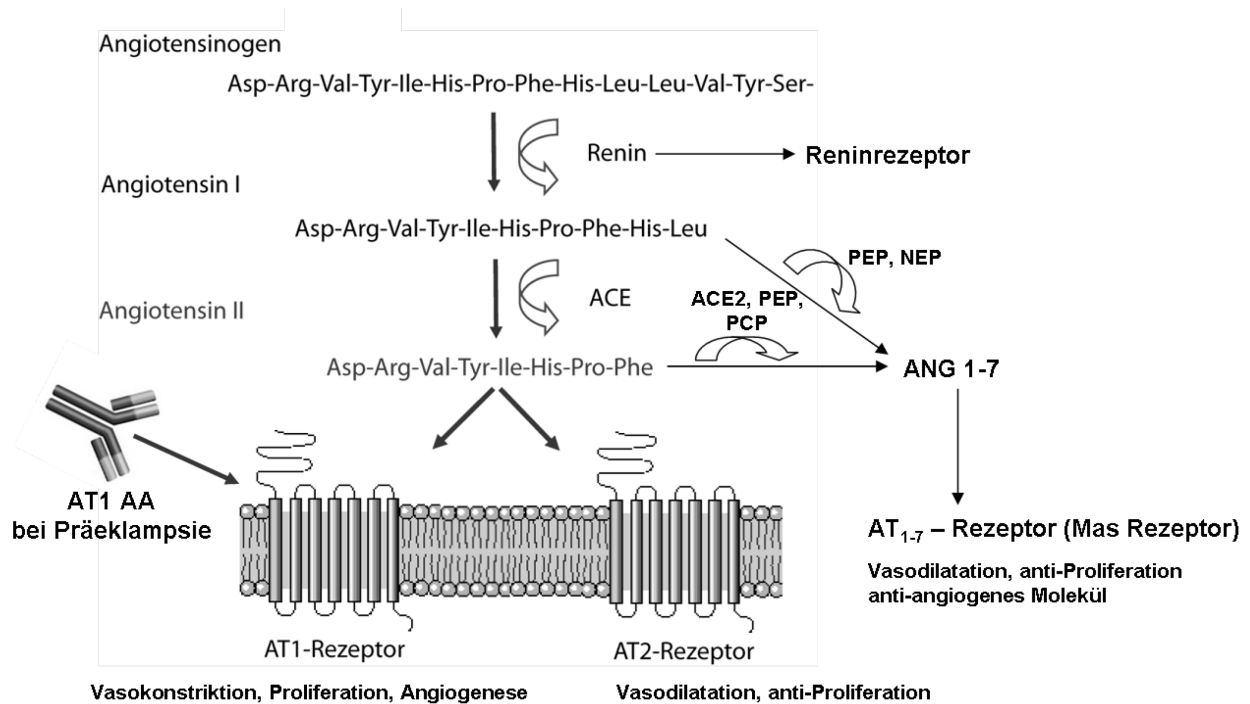
#### 3.2.1 Komponenten des RAS

Das klassische RAS beginnt mit der Biosynthese der Protease Renin (REN) in den juxtaglomerulären Zellen der Niere. Die bekannteste Funktion von Renin ist die Spaltung des hauptsächlich in der Leber gebildeten Angiotensinogens (AGT) in biologisch inaktives Angiotensin I (ANGI), welches durch das *angiotensin-converting-enzyme* (ACE) in biologisch aktives Angiotensin II (ANGII) gespalten wird. Während Renin und Angiotensinogen relative lange Halbwertszeiten im Blutplasma haben, werden Angiotensin I und Angiotensin II innerhalb von Sekunden durch die Wirkung von Angiotensinasen gespalten, wobei hauptsächlich Angiotensin III, Angiotensin 1-7 (ANG1-7) und Angiotensin 3-8 entstehen. Angiotensin II bindet an den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (AT1-R), einen in vielen Geweben verbreiteten 7-Transmembranrezeptor. Über ein G-Protein kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C und dadurch zur Aktivierung von Kalziumkanälen und der Proteinkinase C. So vermittelt der AT1-R die Kontraktion von glatten Gefäßmuskelzellen und die Freisetzung von Aldosteron sowie Vasopressin. Zur Regulation der Transkription und Expression von Proteinen, die das Wachstum und die Proliferation von Zielgeweben fördern, setzt sich die AT1-R Signalkaskade über MAP- (*mitogen-activated protein*) Kinasen/ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) 1/2 fort. Angiotensin II kann alternativ an den Angiotensin II Typ 2 Rezeptor (AT2-R) binden, der ebenfalls ein G-Protein gekoppelter, 7-Transmembranrezeptor ist. Er wird in fötalem Gewebe hoch exprimiert. Postnatal sinkt seine Expression stark ab, ist aber in Herz, Niere und Gefäßsystem detektierbar. Nach Aktivierung durch Angiotensin II wird er im Gegensatz zum AT1-R nicht internalisiert und vermittelt daher eher Langzeiteffekte, wie Vasodilatation und wirkt der Proliferation entgegen.<sup>59</sup> (s. Abb. 7)

Zu den neueren Komponenten des RAS gehört das biologisch aktive Heptapeptid Angiotensin 1-7. Es entsteht entweder direkt aus Angiotensin I oder wird aus Angiotensin II gespalten. Der Abbau zu biologisch inaktiven Spaltprodukten erfolgt durch *ACE* oder Aminopeptidasen. Die Wirkung von Angiotensin 1-7 ist der von Angiotensin II generell entgegengesetzt. So vermittelt Angiotensin 1-7 durch Bindung an seinen ANG1-7 Mas Rezeptor Vasodilatation und hemmt das Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen. Angiotensin 1-7 kann allerdings auch an den AT1-R und den AT2-R binden.<sup>59</sup> Die Bindung von Angiotensin 1-7 an den AT1-R erfolgt mit geringer Affinität und bewirkt agonistisches Verhalten in Abwesenheit von Angiotensin II, während Angiotensin 1-7 in Anwesenheit von Angiotensin II antagonistisch durch Aktivierung des Mas Rezeptors wirkt.<sup>60</sup> (s. Abb. 7)

Das *angiotensin-converting-enzyme 2* (*ACE2*) ist ein Homolog von *ACE*, spaltete aber im Gegensatz zu *ACE* nur eine carboxyterminale Aminosäure von seinem Peptidsubstrat ab.<sup>61</sup> *ACE2* baut entweder Angiotensin II zu Angiotensin 1-7 ab oder wandelt Angiotensin I in Angiotensin 1-9 um, welches weiter zu Angiotensin 1-7 gespalten werden kann.<sup>62</sup> Allerdings ist die Affinität von *ACE* zu Angiotensin I deutlich stärker als die von *ACE2* zu Angiotensin I. Weiterhin ist die katalytische Effizienz von *ACE2* für Angiotensin II 400x stärker als die für Angiotensin I.<sup>63</sup>

Neben dem systemischen zirkulierenden RAS, welches an der akuten Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts, des Blutdrucks und der Pathophysiologie kardiovaskulärer und renaler Krankheiten beteiligt ist, existieren gewebespezifische lokale Renin-Angiotensin-Systeme zum Beispiel im Gehirn, der Niere, dem Herz und der uteroplazentaren Einheit. Ein lokales RAS vermittelt seine Wirkung parakrin, autokrin oder sogar intrakrin und vermittelt eher subakute Effekte.<sup>59</sup>



**Abbildung 7. Renin-Angiotensin-System**

Das RAS besteht aus dem Hormon Angiotensinogen, welches durch die Enzyme Renin und *angiotensin-converting-enzyme* (ACE) in biologisch aktives Angiotensin II gespalten wird. Über die Angiotensin II Typ 1 (AT1-R) und Typ 2 (AT2-R) Rezeptoren vermittelt ANGII seine Signaltransduktion. Sowohl aus ANG I als auch aus ANGII kann durch Wirkung der Prolylendopeptidase (PEP), des ACE2, der neutralen Endopeptidase beziehungsweise Neprilysin (NEP) oder der Prolylcarboxypeptidase (PCP) das biologisch aktive ANG1-7 hervorgehen, welches über den AT<sub>1,7</sub> Mas Rezeptor seine Wirkung vermittelt. Im Serum von präeklampsischen Schwangeren können die den AT1-R aktivierenden Autoantikörper (AT1AA) nachgewiesen werden. (nach Doktorarbeit Florian Herse, 2007)

### 3.2.2 Einfluss des RAS auf Blutdruck, Herz und Nieren

Durch eine Angiotensin II vermittelte Aktivierung des AT1-R kommt es in der Niere zur Wasser- sowie Natriumretention und dem Einsetzen des Durstgefühls. Die Erhöhung des Blutvolumens und eine Angiotensin II-getriggerte Vasokonstriktion bewirken einen Anstieg des Blutdrucks. Im Herz begünstigt eine Stimulation des AT1-R die Proliferation der Fibroblasten, die Entstehung von Hypertrophie und endothelialer Dysfunktion. Die AT2-R Signalkaskade ruft wahrscheinlich Vasodilatation, Apoptose und Natriurese hervor, ist allerdings weniger gut charakterisiert.<sup>59</sup> Im Herz induziert Angiotensin II Hypertrophie, vermittelt die Bildung von Kollagen 1 in glatten Muskelzellen und die Expression von Fibronectin sowie CTGF.<sup>40, 64</sup>

Angiotensin 1-7 übt im Herz eine kardioprotektive Wirkung aus, die unabhängig vom Blutdruck zu sein scheint. So konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine chronische Angiotensin 1-7 Infusion die Angiotensin II-induzierte Fibrosierung

reduzierte.<sup>65</sup> Des Weiteren konnte ein anti-hypertropher Effekt nach Aktivierung des Mas Rezeptors in Ratten-Kardiomyozyten beobachtet werden.<sup>66</sup> Die Rolle von Angiotensin 1-7 in der Niere hinsichtlich der Wasser- und Salzausscheidung beziehungsweise ihrer Re-Absorption wird aktuell gegensätzlich diskutiert. Ebenfalls kontrovers diskutiert wird, ob Angiotensin 1-7 in die Regulation des Blutdrucks involviert ist.<sup>60</sup>

### 3.2.3 RAS während der Schwangerschaft

Unter dem Einfluss der Schwangerschaft verändern sich die Komponenten des zirkulierenden RAS und es kommt ein lokales RAS in der Dezidua und eines in der Plazenta hinzu.<sup>67</sup> In früheren Studien konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Dysregulation des zirkulierenden und des lokalen RAS in die Pathogenese der Präeklampsie involviert zu sein scheint.<sup>68</sup> Die Existenz eines eigenen RAS in der Dezidua soll seine besondere Funktion während der Prozesse an den Spiralarterien hervorheben.<sup>67</sup>

Während der normalen Schwangerschaft steigen zirkulierendes Renin, Angiotensinogen, Angiotensin I, Angiotensin II, Angiotensin 1-7 und Aldosteron an. ACE ist die einzige Komponente des RAS, die während der Schwangerschaft abfällt.<sup>67</sup> Allerdings ist die Sensitivität gegenüber Angiotensin II stark reduziert.<sup>69</sup> Bei Präeklampsie sind die Reninaktivität, Angiotensin I, Angiotensin II, Angiotensin 1-7 und Aldosteron im Blut gegenüber der normalen Schwangerschaft vermindert. Verglichen mit nicht schwangeren Frauen ist das RAS während der präeklampsischen Schwangerschaft noch immer aktiviert. Eine Ausnahme bildet Angiotensin 1-7, welches bei Präeklampsie verglichen mit nicht Schwangeren reduziert ist.<sup>67</sup> Präeklampsische Patientinnen zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Angiotensin II. So sprechen Patientinnen, die später Präeklampsie entwickeln, stärker auf Angiotensin II an, das heißt, es ist eine geringere Angiotensin II Dosis erforderlich, um eine Erhöhung des diastolischen Blutdrucks um 20 mmHg zu erreichen.<sup>70</sup>

Als Mechanismus für die gesteigerte Angiotensin II Sensitivität bei Präeklampsie wird die Dimerisierung des AT1-R mit dem Bradykinin B2- (BK B2) Rezeptor diskutiert. Stabile AT1-R/BK B2-Rezeptor Dimere ebenso wie der BK B2-Rezeptor allein können in präeklampsischen Schwangeren vermehrt nachgewiesen werden. Aufgrund der Dimerisierung ist die Angiotensin II-induzierte Signaltransduktion des

AT1-R verstärkt. Eine Dimerisierung des AT1-R mit dem AT2-R verhindert hingegen die für die G-Protein Aktivierung essentielle Konformationsänderung des AT1-R, sodass die Angiotensin II Sensitivität während unauffälliger Schwangerschaften vermindert wird.<sup>59</sup> Eine weitere Erklärung für die gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Angiotensin II bietet das Auftreten der in unserer Arbeitsgruppe in früheren Studien untersuchten AT1AA in der Zirkulation präeklampsischer Frauen, während AT1AA in normalen Schwangerschaften nicht nachweisbar sind.<sup>71</sup>

Auch das lokale uteroplazentare RAS ist bei Präeklampsie verändert: So wird einer Untersuchung unserer Arbeitsgruppe zufolge der AT1-R in der Dezidua von präeklampsischen Schwangeren verstärkt exprimiert.<sup>72</sup> Die Angiotensin II-bildende Chymase wird in präeklampsischen Trophoblasten überexprimiert.<sup>73</sup> In präeklampsischen Plazentazotten lässt sich mehr Angiotensin II, Angiotensinogen und AT1-R nachweisen als in den Plazentazotten unauffälliger Schwangerschaften. Die Expression von Angiotensin 1-7 und ACE2 in den Plazentazotten sind unbeeinflusst von einer Präeklampsie.<sup>74</sup> Diese durch Angiotensin II induzierte Vasokonstriktion in den Plazentazotten soll die Austauschfläche für Sauerstoff und Nährstoffe vermindern,<sup>75</sup> den *remodeling*-Prozess verschlechtern und den uteroplazentaren Blutstrom reduzieren.<sup>76</sup>

Unabhängig von einer Präeklampsie sind Renin, ACE und Angiotensinogen in der Dezidua stärker exprimiert als in der Plazenta, während der AT1-R in der Plazenta überexprimiert ist.<sup>72</sup> Stark exprimiert ist der AT1-R auf Trophoblasten. Eine Aktivierung des AT1-R stimuliert unter anderem die Expression von Proteinen wie dem *plasminogen activator inhibitor 1 (PAI1)*, der die Invasion von Trophoblasten reduziert,<sup>77</sup> sowie auch die Expression von *sFLT-1*, der in die Angiogenese involviert ist.<sup>78</sup>

### 3.2.4 Ratten-RAS

Um das RAS während der Schwangerschaft besser zu untersuchen, wurden Studien an Rattenmodellen am 19. Tag der Schwangerschaft durchgeführt: Die Schwangerschaft induzierte einen Anstieg der zirkulierenden Angiotensinogen- und Reninspiegel, ACE hingegen war vermindert. Im Gegensatz zur humanen Schwangerschaft kam es in der Ratte zu keiner Veränderung der zirkulierenden Angiotensin I, Angiotensin II und Angiotensin 1-7 Konzentration. Vergleichbar mit der humanen Situation ist die reduzierte Sensitivität gegenüber Angiotensin II während

der Schwangerschaft.<sup>79</sup> In verschiedenen Rattenmodellen für Präeklampsie kann die Existenz der AT1AA nachgewiesen werden.<sup>18, 80</sup>

Im Gegensatz zum Menschen existieren in Ratten und Mäusen zwei AT1-R Subtypen, der weit verbreitete AT1A-R und der AT1B-R, die pharmakologisch nicht unterschieden werden können, aber als Produkte verschiedener Gene unterschiedlich exprimiert und reguliert werden.<sup>81, 82</sup> Entfernt man Mäusen, die während der Schwangerschaft unter Präeklampsie leiden, das AT1A-R Gen, so entwickeln sie weder Bluthochdruck noch Endorganschäden.<sup>83</sup>

### 3.3 *In vivo* Systeme

Die ausgeprägt tiefe Invasion von Trophoblasten beim Menschen ist einzigartig innerhalb der Klasse der Säugetiere und beeinflusst die Entstehung schwangerschaftsspezifischer Erkrankungen wie der Präeklampsie.<sup>84</sup> Die Plazenta von Mensch und Nagetieren hat eine diskoidale Form und lässt sich hinsichtlich der Anzahl der Schichten, die mütterliches von fötalem Gewebe trennen, zum Typ der hämochorialen Plazenta zählen. Bezüglich der föto-maternalen Interdigitation unterscheiden sich die humanen Plazentazotten von der Labyrinthplazenta der Nagetiere.<sup>26</sup> Für Untersuchungen zur Trophoblasteninvasion eignet sich die Ratte mit ihrem ausgeprägten mesometrialen Dreieck und der beobachteten interstitiellen und endovaskulären Invasion, die weit in das mesometriale Dreieck hinein erfolgt, besonders. Bei der Maus ist das mesometriale Dreieck weniger stark ausgebildet, endovaskuläre Invasion konnte nicht nachgewiesen werden und die interstitielle Invasion betrifft lediglich die Dezidua.<sup>85</sup>

Präeklampsie tritt hauptsächlich beim Menschen auf. Es gibt einige wenige beschriebene Fälle, in denen Altweltaffen (*Pan troglodytes*,<sup>86</sup> *Macaca mulatta*,<sup>87</sup> *Gorilla*<sup>88</sup>) präeklampsie-ähnliche Symptome entwickelten. In denen für experimentelle Tierversuche üblichen Labortieren wie Ratte und Maus muss eine Präeklampsie induziert werden. Zu den zur Verfügung stehenden Mechanismen gehören unter anderem die mechanische Verminderung des uteroplazentaren Blutflusses, die Aktivierung des AT1-R durch AT1AA Infusion, die Infusion von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und die Überexpression von Renin und Angiotensinogen.<sup>89</sup>



### 3.3.1 Ischämiemodelle

Werden in der Mitte der Schwangerschaft die *Aa. uterinae* oder die abdominale Aorta nach Abgang der Nierenarterien teilweise verschlossen, kommt es zu einer Verminderung des uteroplazentaren Blutflusses von 40-80%, wodurch der mütterliche Blutdruck in der Schwangerschaft ansteigt, während nicht Schwangere normotensiv bleiben.<sup>89</sup>

Im *RUPP*-(*reduced uterine perfusion pressure*) Rattenmodell werden am 14. Schwangerschaftstag Silberclips mit definiertem Durchmesser um die Aorta oberhalb der Aortenbifurkation und um die Ovarialarterien gelegt, wodurch der Blutfluss zur uteroplazentaren Einheit vermindert ist. Infolge dessen steigt der Blutdruck um 20-30 mmHg an und es entwickelt sich eine Proteinurie, sodass per Definition eine Präeklampsie vorliegt.<sup>90</sup> Im Vergleich mit der humanen Präeklampsie hat das *RUPP*-Rattenmodell das Folgende gemein: Renaler Plasmafluss und glomeruläre Filtrationsrate sind vermindert; endotheliale Dysfunktion wird beobachtet; pro-inflammatorische Proteine wie Interleukin 6 und  $\text{TNF}\alpha$  sind im Plasma erhöht; die Föten sind von *IUGR* betroffen; die zirkulierende *sFLT-1* Konzentration ist erhöht<sup>91</sup> und AT1AA werden produziert.<sup>80</sup> Keinen Einfluss hingegen hat das *RUPP*-Modell auf die interstitielle und endovaskuläre Invasion von Trophoblasten sowie auf den damit verbundenen *remodeling*-Prozess an den Spiralarterien (Doktorarbeit Nele Geusens, Leuven, Belgien, 2010).

### 3.3.2 Infusionsmodelle

Inflammatorische Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  sind während der Präeklampsie zweifach erhöht und tragen zur Entstehung der endothelialen Dysfunktion bei. Eine Infusion von  $\text{TNF}\alpha$  (50 ng/d) in Ratten während dem 14. und 19. Schwangerschaftstag verursacht einen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks (>25 mmHg), der renale Plasmafluss und die glomeruläre Filtrationsrate sind vermindert.<sup>92</sup> Als Antwort auf die  $\text{TNF}\alpha$  Infusion werden AT1AA produziert. Die Gabe von Losartan, einem AT1-R Antagonisten, konnte den unter  $\text{TNF}\alpha$  Infusion beobachteten Blutdruckanstieg vermindern.<sup>80</sup>

Die AT1AA werden ausschließlich in Schwangeren mit Präeklampsie gebildet, während sie in unauffälligen Schwangerschaften nicht nachweisbar sind. Die chronische Applikation von 12 µl/d Ratten-AT1AA (1:50 verdünnt) in schwangere

*Sprague-Dawley* (SD) Ratten vom 12. bis zum 19. Schwangerschaftstag führt zu einem Anstieg des Blutdrucks um 20 mmHg. Dieser Blutdruckanstieg wird durch Gabe von 10 mg/d Losartan im Trinkwasser vermindert.<sup>93</sup>

Viele Symptome einer Präeklampsie können durch die Wirkung der AT1AA, die den auf vielen Zellen befindlichen AT1-R aktivieren, erklärt werden. Werden circa 800 µg Ig G, isoliert aus präeklampsischen humanen Schwangeren, retroorbital in schwangere Mäuse gespritzt, so steigt der Blutdruck nach 4 Tagen signifikant an, die Proteinausscheidung im Urin ist signifikant vermehrt, zirkulierendes *sFLT-1* ist erhöht, die Nieren zeigen eine Schwellung der Endothelzellen und die Föten sind wachstumsretardiert, verglichen mit schwangeren Mäusen, denen Ig G aus Kontrollschwangerschaften appliziert wurde.<sup>94</sup>

### 3.3.3 Transgene Tiermodelle

Einfach transgene Nagetiere für humanes Renin beziehungsweise humanes Angiotensinogen sind normotensiv, da das RAS der Nagetiere nicht mit dem humanen RAS interagieren kann und umgedreht.<sup>95</sup> Wird eine weibliche transgene Maus, die das Gen für humanes Angiotensinogen trägt, mit einer männlichen Maus, transgen für humanes Renin, gekreuzt, so entwickelt diese ab dem 14. Schwangerschaftstag *de novo* Bluthochdruck, während die umgekehrte Kreuzung nicht betroffen ist. Der Blutdruck steigt kontinuierlich bis einen Tag vor Ende der Schwangerschaft an und kehrt nach Geburt auf sein Ausgangsniveau zurück. Die schwangeren Mäuse entwickeln weitere Symptome, wie Proteinurie, vergrößerte Glomeruli, wachstumsretardierte Föten und myokardiale Herzhypertrophie, die dem Krankheitsbild der Präeklampsie entsprechen. Auffällig sind die verminderte Überlebensrate der präeklampsischen Mäuse von 38% und das Auftreten von Krampfanfällen in 15% der Tiere. Diese Beobachtungen führen die Autoren auf die während der Schwangerschaft kontinuierlich ansteigende Produktion von humanem Renin in der Plazenta zurück. Dieses akkumuliert in der Plazenta und wird ins maternale Plasma freigesetzt, wo es humanes Angiotensinogen spalten kann.<sup>96</sup> So korreliert dann auch der Blutdruckanstieg mit der Angiotensin II Konzentration im Plasma. Durch Gabe eines AT1A-Rezeptorblockers lassen sich alle beschriebenen Symptome der Präeklampsie in der Maus verhindern.<sup>83</sup> Humanes Angiotensinogen wird ebenfalls in der Plazenta gebildet, ist aber im mütterlichen Plasma nicht nachzuweisen. Die lokale Aktivierung des humanen RAS in der uteroplazentaren

Einheit der Maus beeinträchtigt lokal den *remodeling*-Prozess an den Spiralarterien und damit die Durchblutung der Plazenta.<sup>76</sup>

Das transgene Mausmodell für Präeklampsie ist auf die Ratte übertragen worden, sodass ein breiteres Spektrum an invasiven Untersuchungen zur Verfügung steht. Der Blutdruck der von Präeklampsie betroffenen Kreuzung (Weibchen transgen für hAGT, Männchen transgen für hREN) steigt ab dem 10. Schwangerschaftstag an, fällt vor Schwangerschaftsende ab und kehrt innerhalb von 3 Tagen auf seinen Ausgangswert zurück. In der umgekehrten, nicht von Präeklampsie betroffenen Kreuzung (Weibchen transgen für hREN, Männchen transgen für hAGT) fällt der Blutdruck im Verlauf der Schwangerschaft sogar ab. In der von Präeklampsie betroffenen Kreuzung ist die humane Reninkonzentration im mütterlichen Plasma stark erhöht. In der nicht von Präeklampsie betroffenen Kreuzung ist humanes Angiotensinogen im Plasma nicht nachweisbar. Obwohl beide Transgene in beiden Kreuzungen in der Plazenta exprimiert sind, wird ausschließlich hREN in die mütterliche Zirkulation freigesetzt.<sup>97</sup> Die Angiotensin II Konzentration in der Plazenta und dem mesometrialen Dreieck ist in der Präeklampsie-Ratte signifikant erhöht, während sie in der umgekehrten Kreuzung ausschließlich in der Plazenta erhöht ist.<sup>98</sup> Die Nachkommen der Präeklampsie-Ratte sind von IUGR betroffen: Gezeigt wird dies einmal durch asymmetrisches Wachstum *in utero*, ermittelt durch das Verhältnis von Abdominalumfang zu Kopfumfang mithilfe von Ultraschalldiagnostik als auch nach Geburt durch das Verhältnis von Lebergewicht zu Hirngewicht. Endotheliale Dysfunktion, wie bei humaner Präeklampsie nachzuweisen, konnte in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe durch Relaxations- und Kontraktionsversuche an isolierten *Aa. uterinae* im Rattenmodell für Präeklampsie gezeigt werden.<sup>99</sup> Weitere von unserer Arbeitsgruppe beobachtete Symptome einer Präeklampsie im Rattenmodell sind eine Albuminurie im letzten Drittel der Schwangerschaft, das Auftreten von AT1AA und die Atherose-ähnlichen Läsionen in den Spiralarterien des mesometrialen Dreiecks.<sup>18</sup> Entgegen der humanen Situation bei Präeklampsie ist die Invasion von Trophoblasten in das mesometriale Dreieck im Präeklampsie-Rattenmodell nicht erniedrigt.<sup>33</sup>

Frauen, die unter chronischem Bluthochdruck leiden, haben ein erhöhtes Risiko, während der Schwangerschaft unter Pfropfgestose zu leiden. In einem doppelt-transgenen, schwangeren Mausmodell (hREN, hAGT) wird diese Pfropfgestose nachgestellt: Der Blutdruck ist schon vor der Schwangerschaft erhöht, steigt

allerdings während der Schwangerschaft weiter an. Es manifestieren sich *de novo* Proteinurie; die *sFLT-1* Expression in der Plazenta ist erhöht; das Herz ist hypertrophiert und Marker einer pathologischen Herzhypertrophie werden vermehrt exprimiert.<sup>100</sup>

### 3.4 *In vitro* Systeme

Vermehrte Proliferation unreifer Zytotrophoblasten, reduzierte Differenzierung in invasive extravillöse Trophoblasten und verminderte Trophoblasteninvasion kennzeichnen die Plazenta einer präeklampsischen Schwangerschaft. Die Gründe dafür können im Trophoblast selbst liegen oder aber in der verminderten Aktivität stimulatorischer Regulatoren beziehungsweise der erhöhten Aktivität inhibitorischer Regulatoren der Trophoblastendifferenzierung und -invasion.<sup>101</sup> Alle Komponenten eines lokalen RAS sind sowohl in der Plazenta als auch in der Dezidua vorhanden. So wird der AT1-R nicht nur in Gefäßen der uteroplazentaren Einheit exprimiert, wo er als Vasokonstriktor den Blutfluss zwischen Uterus, Plazenta und Fötus beeinflusst, sondern während der gesamten Schwangerschaft auch auf Trophoblasten. Der Einfluss von lokal freigesetztem Angiotensin II auf die Proliferation, Apoptose, Invasion und Hormonsekretion wurde in verschiedenen *in vitro* Experimenten untersucht: So vermehrt Angiotensin II die Proliferation von Trophoblasten und trägt damit zum Wachstum der Plazenta bei.<sup>102-104</sup> Die Apoptoserate kann durch Angiotensin II reduziert werden.<sup>104</sup> Abhängig von der Wahl der Zelllinie reduziert Angiotensin II die Invasion von Trophoblasten<sup>77</sup> beziehungsweise erhöht sie<sup>103</sup> im Invasionsexperiment. Angiotensin II erhöht die Sekretion plazentaspezifischer Hormone wie Östradiol,<sup>105</sup> Plazentalaktogen und  $\beta$ 1-Glykoprotein.<sup>106</sup>

*Remodeling*-Prozesse an den Spiralarterien, Trophoblasten Differenzierung und Invasion können durch *in vitro* Experimente untersucht werden. *In vitro* Experimente helfen dabei, die *in vivo* Situation zu rekapitulieren und zu manipulieren. Dabei darf nie aus den Augen verloren werden, dass sie immer nur einen Bruchteil der *in vivo* Situation widerspiegeln.<sup>107</sup>

#### 3.4.1 Explant-Kulturen, Zelllinie

Als *explant*-Kultur der humanen Plazenta bezeichnet man eine intakte, auf extrazellulärer Matrix kultivierte Plazentazotte.<sup>108</sup> Sie besteht aus mehreren

Zelltypen, wie dem Zottentrophoblast, dem fötalen Mesenchym mit Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Blutzellen und plazentaren Immunzellen. So ist der Hauptvorteil der *explant*-Kulturen, dass der Trophoblast auch *in vitro* in Cokultur mit entsprechenden Zellen existiert. Nachteilig hingegen ist die Unfähigkeit, Aktivitäten bestimmter Zelltypen auch auf diese zu reduzieren. Kritisch für die Funktion und Überlebensfähigkeit der *explant*-Kulturen sind unter anderem der Sauerstoffgehalt, auftretende Infektionen, das Nährstoffangebot und veränderte Hormon- und Zytokinspiegel.<sup>109</sup>

*Explant*-Kulturen von Plazenten aus dem ersten Trimester werden auf eine dünne Schicht Kollagen 1 oder extrazelluläre Matrix (Matrigel) gesetzt, auf der sie sich anheften. Die Auswanderung von Trophoblasten aus der *explant*-Kultur erfolgt vorrangig durch Migration während die Proliferation angehefteter Zellen eine untergeordnete Rolle spielt. *Explant*-Kulturen können zur Untersuchung von Proliferation, Adhäsion und Migration extravillöser und villöser Trophoblasten herangezogen werden.<sup>109</sup>

Das Arbeiten mit primären Trophoblasten ist dadurch erschwert, dass sie in Kultur ihre Proliferationsfähigkeit verlieren. Eine nach Kliman<sup>110</sup> isolierte Zytotrophoblastenkultur ist meist kontaminiert mit anderen Trophoblastentypen sowie Fibroblasten. Zudem ist die Menge an Trophoblasten, die aus einer Plazenta isoliert werden kann, begrenzt, erst recht, wenn es sich um eine Plazenta aus dem ersten Trimester handelt.<sup>111</sup>

Die Zelllinie BeWo entstammt einem humanen Chorionkarzinom und entspricht Zytotrophoblasten mit vermehrter Apoptose- und Proliferationsrate. Das Wachstum der Plazenta in den Uterus hinein wird mit dem Wachstum eines Karzinoms verglichen, außer dass die Invasion der Plazenta an der Grenze zwischen Endometrium und Myometrium anhält.<sup>103</sup>

Die Trophoblastenzelllinie HTR8/SVneo entstammt ausgewanderten Zellen humaner *explant*-Kulturen des ersten Trimesters und ist aufgrund der Transformation mit dem *simian virus (SV) 40 large T antigen* unsterblich. HTR8/SVneo Zellen exprimieren Cytokeratin 18 und Integrine, die für extravillöse Trophoblasten spezifisch sind.<sup>112</sup>

SGHPL4 (PL4) Zellen entstammen ebenfalls extravillösen Zellen humaner *explant*-Kulturen des ersten Trimesters und haben aufgrund der Transformation mit dem *SV40 large T antigen* eine verlängerte Lebenszeit. Sie sind nicht unsterblich und werden

lediglich bis Passage 25 verwendet. PL4 Zellen exprimieren Cytokeratin 7 sowie HLA-G, das spezifisch für extravillöse Trophoblasten ist. Zudem verhalten sie sich in einer Fibrinmatrix invasiv und sezernieren humanes Choriongonadotropin sowie humanes Plazentalaktogen.<sup>113, 114</sup>

### 3.4.2 Experimentelle Ansätze

In den Plazentazotten fusionieren Zytotrophoblasten ständig zu Synzytiotrophoblasten: Zytotrophoblasten exprimieren inaktive Effektor- und Initiatorcaspasen sowie Apoptoseinhibitoren, wie Bcl-2 Proteine. Ausschließlich die Initiatorcaspasen werden im Zytotrophoblasten aktiviert und regulieren die Fusion, indem sie die Verbindung zwischen Zytoskelett und Zellmembran aufheben und den Phosphatidylserin-Flip auslösen. Im Zuge der Fusion werden Zytoplasma und Zellkerne der Zytotrophoblasten in den Synzytiotrophoblast überführt, sodass letzterer die vollständige Apoptosemaschinerie inklusive anti-apoptotischer Proteine enthält. Nach einigen Wochen wird die Apoptose durch Aktivierung der Effektorcaspasen ausgelöst; die dazu führenden Mechanismen sind bisher unbekannt. Im Verlauf des Invasionsweges verändert sich die Anfälligkeit extravillöser Trophoblasten gegenüber der Apoptose beginnend mit der Expression von Todesrezeptoren und Bcl-2 Proteinen, über die Expression der Effektorcaspase 3 hin zum programmierten Zelltod tief in der Dezidua.<sup>115</sup>

Nekrose erfordert im Gegensatz zur Apoptose keine Zellenergie und resultiert in der Freisetzung von Zytoplasma und Zellorganellen in die extrazelluläre Matrix, sodass eine inflammatorische Antwort induziert wird.<sup>116</sup>

Bei Präeklampsie ist der Umsatz von Trophoblasten gegenüber normalen Schwangerschaften erhöht, beginnend mit einer erhöhten Proliferationsrate der Zytotrophoblasten und einer erhöhten Apoptoserate. Apoptose wird zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Fusion ausgelöst. Kann die Apoptosekaskade aufgrund des hohen Materialinputs durch Proliferation und Fusion nicht vollständig ablaufen, werden Teile des Synzytiotrophoblasten in die extrazelluläre Matrix freigesetzt; ein Prozess, der Aponekrose genannt wird.<sup>115</sup>

Mobilität, die Fähigkeit zur Bewegung, wird auf unbeschichteten Zellkulturplatten untersucht. Ohne Vorhandensein einer extrazellulären Matrix ist die Apoptoserate primärere Zytotrophoblasten erhöht ebenso wie die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination mit Fibroblasten.<sup>109</sup>

Unter dem Begriff Migration versteht man die aktive gerichtete oder ungerichtete Bewegung von Zellen durch Bildung von Zellfortsätzen und deren Anhaftung an die extrazelluläre Matrix. So wandern Trophoblasten aus *explant*-Kulturen heraus und bewegen sich auf der mit Kollagen 1 oder Matrigel beschichteten Zellkulturoberfläche fort. Ein typisches *in vitro* Migrationsexperiment untersucht die Bewegung von Trophoblasten durch die Membran eines *transwell*-Einsatzes hindurch.

Invasion hingegen beschreibt die Migration von Zellen in eine dreidimensionalen Matrix hinein und die dazu erforderliche Degradierung der extrazellulären Matrix. *In vitro* wird die dreidimensionale Matrix durch ein Fibrin- oder Matrigel imitiert, wobei letzteres immer auch Wachstumsfaktoren enthält.<sup>117</sup> Die Invasion von Trophoblasten wird von einer Verminderung ihrer Proliferationsrate und der veränderten Expression von Molekülen begleitet, die Zelladhäsion vermitteln beziehungsweise die extrazelluläre Matrix degradieren.<sup>118</sup> *Cell adhesion molecules (CAM)*, wie *Cadherine*, *Integrine* oder *Selectine*, werden auf der Oberfläche invasiver Trophoblasten exprimiert und interagieren mit der extrazellulären Matrix. Während der Differenzierung von Zytotrophoblasten in invasiven Trophoblasten kommt es zu einer Veränderung des CAM Expressionsmusters. Dies ist gestört bei Präeklampsie, sodass invasive Trophoblasten bei Präeklampsie ein anderes Muster an CAM exprimieren.<sup>119</sup> Unerlässlich für eine erfolgreiche Invasion ist eine Balance zwischen der Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMP), die die extrazelluläre Matrix degradieren und ihrer gewebespezifischen Inhibitoren (*tissue inhibitor of matrix metalloproteases, TIMP*). Bei Präeklampsie wird MMP-9 von Trophoblasten zwar als inaktive Vorstufe sezerniert, die Aktivierung ist aber vermindert gegenüber normalen Schwangerschaften.<sup>120</sup> HLA-G wird auf der Oberfläche von Trophoblasten vermehrt exprimiert, wenn sich diese in Richtung des invasiven Phänotyps differenzieren, um die Zelle vor Lysierung durch natürliche Killerzellen zu schützen. Die Expression von HLA-G auf extravillösen Trophoblasten ist reduziert bei Präeklampsie.<sup>121</sup>

### 3.5 Ziele

Die schwangerschaftsspezifische Erkrankung Präeklampsie hat fatale Auswirkungen auf die Gesundheit von Mutter und Nachwuchs sowohl während der Schwangerschaft als auch im späteren Leben. Ursächlich beteiligt an der Entstehung einer Präeklampsie ist das Renin-Angiotensin-System. Daher ist das Hauptziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss des uteroplazentaren und zirkulierenden Renin-Angiotensin-Systems auf die physiologische Schwangerschaft und die Präeklampsie im Rattenmodell zu charakterisieren.

Um die Effekte von erhöhtem zirkulierenden Angiotensin II zu untersuchen, wird Angiotensin II erstmalig chronisch und systemisch in schwangere Ratten infundiert, wobei die Angiotensin II Konzentration, die zu stabiler Blutdruckerhöhung führt, zu ermitteln ist. Demgegenüber stehen transgene Versuchstiergruppen, in denen entweder ausschließlich uteroplazentares Angiotensin II beziehungsweise zirkulierendes und uteroplazentares Angiotensin II erhöht sind.

Im Zuge der Charakterisierung der unterschiedlichen Schwangerschaften sind Organsysteme wie das Herz-Kreislauf-System, die Niere und die uteroplazentare Einheit, aber auch der Fötus als eigenständiger Organismus von besonderem Interesse. Sie sollen wiederholt zu definierten Zeitpunkten der Schwangerschaft untersucht und gegebenenfalls mit ihrem Zustand vor Beginn der Schwangerschaft verglichen werden.

In verschiedenen experimentellen Ansätzen soll die Wirkung von Angiotensin II auf physiologische Prozesse der Trophoblasten *in vitro* untersucht und Parallelen zur Invasion der Trophoblasten in den verschiedenen Tiermodellen gezogen werden.

Insgesamt soll dieses Projekt zum besseren Verständnis pathologischer Prozesse, die in die Entstehung einer Präeklampsie involviert sind, beitragen. Auch dient eine genaue Charakterisierung von Schwangeren mit Präeklampsie und ihrer Nachkommen der Abschätzung ihres Risikos für Erkrankungen im späteren Leben.



## 4 Material

### 4.1 Antikörper

Anti-ANG1-7 für RIA	Cleveland Clinic, Cleveland, USA
Anti- $\alpha$ -Aktin, 1A4 ( <i>mouse anti-human</i> )	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-cCaspase 3, 5A1E ( <i>rabbit anti-human</i> )	Cell Signaling Technologies, Danvers, USA
Anti-CD 31, TDL-3A12 ( <i>mouse anti-rat</i> )	BD Biosciences Pharmingen, San Diego,
Anti-Cytokeratin, MNF 116 ( <i>mouse anti-human</i> )	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-IgG ( <i>goat anti-mouse</i> )	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-IgG, ( <i>goat anti-rabbit</i> ) für RIA	Sigma-Aldrich, München, D
Anti-IgG, Cy 3 conjugated ( <i>donkey anti-mouse</i> )	Dianova, Hamburg, D
Anti-IgG, Cy 3 conjugated ( <i>donkey anti-rabbit</i> )	Dianova, Hamburg, D
Anti-IgG, PO conjugated ( <i>goat anti-mouse</i> )	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Anti-Ki-67, MIB-1 ( <i>mouse anti-human</i> )	Dako, Glostrup, Dänemark

### 4.2 Chemikalien und Reagenzien

0,9% sterile, isotonische Kochsalzlösung	B. Braun, Melsungen, D
1,10-Phenantrolin	Sigma-Aldrich, München, D
1,20 ortho-Phenantrolin-Monohydrat	Sigma-Aldrich, München, D
1mg/ml Kollagenlösung	Sigma-Aldrich, München, D
2% Xylocainsalbe	AstraZeneca, Wedel, D
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
37% Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, D
Aceton	Sigma-Aldrich, München, D
Actinomycin D	Calbiochem, Gibbstown, USA
Aliskiren	Novartis, Nürnberg, D
ANG1-7 Standard für RIA	Bachem, Weil, D
ANG1-7 tracer ( $^{125}\text{I}$ -ANG1-7)	AG Chappell, Wake Forest, Winston, USA
ANGII Antiserum "Celine III"	AG Bader, MDC, Berlin, D
ANGII Standard für RIA	Bachem, Weil, D
ANGII Tracer ( $^{125}\text{I}$ -Tyr4-ANGII)	NEN (PerkinElmer), Waltham, USA
Angiotensin II, human	Calbiochem, Gibbstown, USA
APAAP Komplex	Dianova, Hamburg, D
Aprotinin	Sigma-Aldrich, München, D
Augensalbe <i>Liquifilm</i>	Pharm Allergan, Ettlingen, D

BCIP	Sigma-Aldrich, München, D
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich, München, D
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
DAB	Dianova, Hamburg, D
Dextran T70	Amersham Pharmacia, Freiberg, D
Diethylether	Fischar, Saarbrücken, D
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, D
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, D
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, D
<i>EGF</i>	EMD4 Biosciences, Gibbstown, USA
Eponkunstharzgemisch	Serva, Heidelberg, D
Eserserum	Dianova, Hamburg, D
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, D
Eukitt®	Fluka Chemie, Basel, Schweiz
Fibrinogen ( <i>bovine</i> )	Sigma-Aldrich, München, D
Forene® (Isofluran)	Abbot, Wiesbaden, D
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, D
Glycidether 100	Serva, Heidelberg, D
Hämatoxylin Delafield	Chroma, Münster, D
Hepes	Sigma-Aldrich, München, D
HFBA	Merck, Darmstadt, D
Histo-Clear®	EMS, Hatfield, USA
Isopentan	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kakodylatpuffer	Fluka Chemie, Basel, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kalziumacetat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Kaninchenserum	Sigma-Aldrich, München, D
Losartan	Calbiochem, Gibbstown, USA
Magermilchpulver	BioRad, München, D
Mayer's Hematoxylin	Dianova, Hamburg, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Natrium p-Hydroxymercurbenzoat	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe, D

Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, D
NBT	Sigma-Aldrich, München, D
Neomycin	Sigma-Aldrich, München, D
Norit A Kohle	Serva, Heidelberg, D
Osmiumsäure	Sigma-Aldrich, München, D
Paraffin	Sherwood Medical, St. Louis USA
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, D
PBS -/-	Gibco, Darmstadt, D
Pepstatin	Peninsula Labs, Belmont, USA
Perjodsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich, München, D
Polyethylenglycol	Sigma-Aldrich, München, D
Propylenoxid	Serva, Heidelberg, D
QIAzol Lysepuffer	Qiagen, Hilden, D
RNA-, DNA-, RNase- und DNase freies <i>RNase Away</i> ®	Fluka Chemie, Basel, Schweiz MBP, San Diego, USA
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, D
Saponin	Sigma-Aldrich, München, D
Schiffs Reagenz	Klinipath, Duiven, Niederlande
<i>sirius red</i> Farbstoff	Sigma-Aldrich, München, D
TBS Tabletten	Sigma-Aldrich, München D
Thrombin	Sigma-Aldrich, München, D
TNF $\alpha$	RD Systems, Wiesbaden, D
Toluol	Sigma-Aldrich, München, D
Tris	Sigma-Aldrich, München, D
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe, D
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, München, D
Trypanblau	Biochrom, Berlin, D
Trypsintabletten	Sigma-Aldrich, München, D
Tween-80	Sigma-Aldrich, München, D
Uranylacetat	Merck, Darmstadt, D
Vectashield® Mounting Medium mit DAPI	Vector Labs, Southfield, USA
Wasserstoffperoxid	Carl Roth, Karlsruhe, D

WFML-1	AnaSpec, San Jose, USA
Wundkleber Vetbond™	3M, St. Paul, USA
Xylol	Sigma-Aldrich, München, D
Zinkacetat	Carl Roth, Karlsruhe, D
Zinkchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, D
Zitronensäure	Carl Roth, Karlsruhe, D

### 4.3 Enzyme

$\alpha$ -Amylase	Sigma-Aldrich, München, D
-------------------	---------------------------

### 4.4 Geräte und Laborhilfsmittel

Aliquotierer, Multipette	Eppendorf, Hamburg, D
Axioplan-2 Imaging Mikroskop	Carl Zeiss, Jena, D
CCD Kamera (verbunden mit IX-70)	Hamamatsu, Herrsching, D
chirurgisches Präparationsbesteck	AF Medical, Kreuzlingen, Schweiz
CO <sub>2</sub> Inkubatoren	Heraeus Instruments, Hanau, D
DNA <i>Thermal Cycler</i>	Perkin Elmer, Waltham, USA
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, D
Magnetrührer, beheizbar	Ikamag® Ret, Staufen, D
Metabolische Käfige	Tecniplast, Gazzada, Italien
NanoDrop® 1.000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Osmotische Pumpen, Modell 2002	Alzet, Cupertino, USA
pH Meter	Beckman Coulter, München, D
Phasenkontrastmikroskop IX-70	Olympus, Hamburg, D
Precellys 24 Homogenisator	Peqlab, Erlangen, D
Rotationsmicrotom	Microm, Walldorf, D
SpectraFluor Plus Plattenreader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Speed Vac Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, D
Sterilbank	Heraeus Instruments, Hanau, D
TaqMan 7.500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Telemetrieequipment	Data Sciences Int., St. Paul, USA
Telemetriesender TA11 PA-C40	Data Sciences Int., St. Paul, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Transmissionselektronenmikroskop	Carl Zeiss, Jena, D
Ultramicrotom	Reichert-Jung, München, D
Univentor 400 Anästhesieeinheit	AgnTho's AB, Stockholm, Schweden

Vortex Mixer	Neolab, Heidelberg, D
Wärmelampe (Rotlicht)	Philips, Hamburg, D
Wärmeplatte <i>hot plate</i> 062	Lab Market, Mannheim, D
Zentrifuge 5424, 5810 R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge GS 6KR	Beckman Coulter, München, D
$\gamma$ -counter 1470 Wizard	Amersham Pharmacia, Freiburg, D

#### 4.5 Kits

Albumin (Ratte) -ELISA	CellTrend, Luckenwalde, D
ANGI RIA	Peninsula Laboratories, San Carlos, USA
Bühlmann ANGII RIA	Alpco Diagnostics, Salem, USA
<i>High-Capacity cDNA RT Kit</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
RNase freies DNase Set	Qiagen, Hilden, D
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
TaqMan Fast Universal PCR-Mastermix (2x)	Applied Biosystems, Foster City, USA

#### 4.6 Verbrauchsmaterialien

0,2 µm Sterilfilter	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
2,8 mm Precellys-Keramikkügelchen	Peqlab, Erlangen, D
Combitips plus (1, 5, 10 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
<i>Cryotube™ Vials</i>	Nunc, Langenselbold, D
Einbettkassetten für Paraffinschnitte	Roth, Karlsruhe, D
Einmalpipetten (5, 10, 25 µl)	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
<i>Gelatin Coated Cytodex3 Microcarrier Beads</i>	Sigma-Aldrich, München, D
<i>Micro Amp® Fast Optical 96-well Reaction</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Micro Amp™ Optical Adhesive Film</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
Multiwell - Zellkulturplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz
Objektträger für Paraffinschnitte, beschichtet	Thermo Scientific, Braunschweig, D
PAP Pen	Abcam, Cambridge, USA
Pipettenspitzen(0,1-10, 10-100, 100-1000µl)	Starlab, Ahrensburg, D
Polymerisierungsförmchen EM	SPI, West Chestern, USA
Reaktionsgefäße, (1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Sep-Pak® vac C <sup>18</sup> Säulen	Waters, Milford, USA
Zellkulturflaschen (25, 75 cm <sup>2</sup> )	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	BD Falcon, Franklin Lakes, USA

#### 4.7 Zellkulturmedien und –zusätze

Amphotericin B	Sigma-Aldrich, München, D
<i>DMEM low glucose</i>	Sigma-Aldrich, München, D
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, D
<i>FCS</i>	Biochrom, Berlin, D
Ham's F10	Sigma-Aldrich, München, D
Ham's F12	Sigma-Aldrich, München, D
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, München, D
PBS -/-	Gibco, Darmstadt, D
Penicillin	Sigma-Aldrich, München, D
Ringerlösung	B. Braun, Melsungen, D
Streptomycin	Sigma-Aldrich, München, D
Trypsin/EDTA 0,25%	Invitrogen, Karlsruhe, D

#### 4.8 Programme

7.500 Fast System Software	Applied Biosystems, Foster City, USA
Adobe Illustrator CS4	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
AxioVision 4.6	Carl Zeiss, Jena, D
Dataquest ART 4.0	Data Sciences Int., St. Paul, USA
EndNote	Thomson Reuters, Carlsbad, USA
GraphPad Prism Plus 5	GraphPad Software, La Jolla, USA
Image Pro-Plus	Media Cybernetics, Bethesda, USA
ImageJ	NIH, kostenfrei erhältlich
Primer Express® 3.0	Applied Biosystems, Foster City, USA
SPSS 16	IBM, Chicago, USA
Word, Exel, Powerpoint Office® 2003	Microsoft, Unterschleißheim, D

## 5 Methoden

### 5.1 Tierphysiologische Methoden

#### 5.1.1 Tierhaltung

Alle Tierversuche wurden von der Tierschutzkommission des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (Genehmigungsnummern 0268/06 und 0156/07) und ordnungsgemäß aufgezeichnet.

Die Tierversuche erfolgten an 6–10 Wochen alten *Rattus norvegicus* des Stammes *Sprague-Dawley* (SD), die ich aus Zuchten der AG Bader, Max Delbrück Center for Molecular Medicine Berlin-Buch (MDC), bezog. Es handelt sich um einen in der medizinischen Forschung exzessiv genutzten Auszuchtstamm von Albinoratten.

Alle Tiere wurden während der gesamten Zeit der Versuchsdurchführung unter konventionellen Bedingungen ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , Wasser und Standardfutter *ad libitum*, künstlicher 24 Stunden Tag- und Nachtrhythmus) in den Tierställen des MDC gehalten.

#### 5.1.2 Tierversuchsgruppen

Zur Untersuchung der Präeklampsie wurde ein von Bohlender et al. etabliertes transgenes Rattenmodell herangezogen. Es wurden Weibchen, transgen für humanes Angiotensinogen [TGR(hAGT)L1623], mit Männchen, transgen für humanes Renin [TGR(hREN)L10], gepaart. Während der Schwangerschaft entwickelten diese Weibchen *de novo* Bluthochdruck und Proteinurie, womit per Definition eine Präeklampsie besteht, zumal sich beide Parameter nach Geburt der Jungtiere wieder normalisierten.<sup>97</sup> Diese Gruppe wird daher im Folgenden als PE+ (Präeklampsie positiv) bezeichnet.

Kreuzt man hingegen ein Weibchen, transgen für humanes Renin, mit einem Männchen, transgen für humanes Angiotensinogen, entstehen während der Schwangerschaft weder Bluthochdruck noch Proteinurie.<sup>18</sup> Daher wird diese Gruppe PE- (Präeklampsie negativ) genannt.

Für die Kontrollgruppe wurden Wildtyp Weibchen mit Wildtyp Männchen gekreuzt; die Schwangerschaft verlief hinsichtlich Bluthochdruck und Proteinurie unauffällig. Diese Gruppe wurde als WT (Wildtyp) Gruppe bezeichnet.

Wurden in schwangere Wildtyp Weibchen, die von einem Wildtyp Männchen begattet waren, ANGII gefüllte Minipumpen implantiert, wurden diese Gruppen in Abhängigkeit der ANGII Dosis als ANGII + (435 ng/kg/min) beziehungsweise ANGII ++ (1 µg/kg/min) bezeichnet.

Des Weiteren wurden nicht schwangere Weibchen, transgen für humanes Renin (PE- nicht schwanger) beziehungsweise humanes Angiotensinogen (PE+ nicht schwanger), sowie nicht schwangere Wildtyp Weibchen (WT nicht schwanger) untersucht, um den Einfluss der Schwangerschaft aufzuzeigen.

### 5.1.3 Tierversuchsprotokoll

Bei den für die Verpaarung vorgesehenen Muttertieren der WT, PE-, PE+, ANGII + und ANGII ++ Gruppe wurden Telemetriesender implantiert; Blutdruck, Herzfrequenz und motorische Aktivität wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Von dieser Operation konnten sich die Tiere 10 Tage erholen, bevor sie zur Begattung zusammen mit einem Männchen über Nacht in einen Käfig zusammengesetzt wurden.

*Rattus norvegicus* sind ab der 5. Woche geschlechtsreif; der Brunftzyklus liegt zwischen 4 bis 6 Tagen und empfängnisbereit sind sie für circa 6 Stunden. Ob die Begattung stattgefunden hat, lässt sich am Vorhandensein des Vaginal- oder Spermaplugs erkennen, der vom Männchen in der Vagina zurückgelassen wird. Er enthält unter anderem Spermien, sodass die Chance auf Befruchtung erhöht wird, je länger der Plug im Vaginaltrakt verbleibt. Ebenso dient er als Barriere gegen Spermien konkurrierender Männchen. Die Tragzeit liegt bei 21 - 23 Tagen, wobei der Tag, an dem der Plug nachgewiesen wurde, der erste Tag (d1) der Schwangerschaft ist. Die Wurfgröße variiert stark, liegt aber meist zwischen 8–14 Nachkommen, wobei bei starker physischer oder psychischer Belastung des Muttertieres Embryonen im Frühstadium der Schwangerschaft resorbiert werden können.

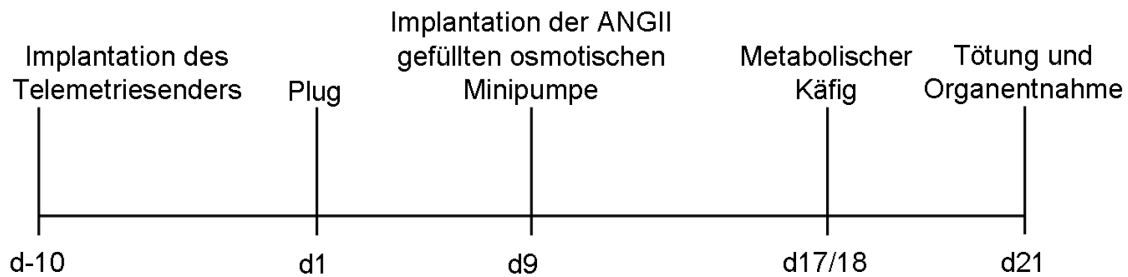
Altersentsprechende nicht schwangere Versuchstiere (WT, PE- und PE+ Gruppe) durchliefen ein vergleichbares Tierversuchsprotokoll, erhielten allerdings keinen Telemetriesender und auch keine osmotische Minipumpe.

In Abhängigkeit vom Tötungstag wurden die Tiere zur Bestimmung des 24 Stunden Urins in metabolische Käfige gesetzt: Der Urin wurde 24 Stunden vor Tötung der Versuchstiere gesammelt, wenn diese am 9. oder 15. Tag der Schwangerschaft getötet wurden beziehungsweise 72 Stunden vor Tötung, wenn diese am 21. Tag der Schwangerschaft erfolgte.

Die Tierversuche endeten am 9., 15. oder 21. Tag der Schwangerschaft. Ausschließlich zu diesen Zeitpunkten wurden Blut und Organe entnommen.

Den Tieren beider ANGII Gruppen (ANGII +, ANGII ++) wurden am 9. Tag der Schwangerschaft osmotische Minipumpen, gefüllt mit ANGII in steriler, isotonischer Kochsalzlösung, implantiert. Dieser Implantationszeitpunkt wurde ausgewählt, da in der PE+ Gruppe der mittlere arterielle Blutdruck ab dem 13. Tag ansteigt und der Blutdruckanstieg in den ANGII Gruppen zeitlich vergleichbar sein sollte (s. Abb. 8).





**Abbildung 8. Versuchsprotokoll der ANGII + und ANGII ++ Gruppe**

#### 5.1.4 Gewinnung des 24 Stunden Sammelurins

An den im Versuchsprotokoll festgelegten Tagen wurden die Ratten zur Gewinnung des 24 Stunden Sammelurins einzeln, unter Beibehaltung der konventionellen Bedingungen der Versuchstierhaltung, in metabolische Käfige gesetzt. Nach 24 Stunden wurde das Urinvolumen ermittelt und feste Urinbestandteile mittels Zentrifugation (100 x g, RT, 3 Minuten) entfernt. Der Überstand wurde in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C aufbewahrt.

#### 5.1.5 Pumpenimplantation

Arterielle Hypertonie wurde in den ANGII Gruppen mittels ANGII Dauerinfusion in einer Dosierung von 435 ng/kg/min beziehungsweise 1 µg/kg/min über einen Zeitraum von 12 Tagen hinweg ab dem 9. Schwangerschaftstag hervorgerufen. In Abhängigkeit des Körpergewichtes am 8. Tag der Schwangerschaft wurden Alzet® osmotische Minipumpen mit in steriler, isotonischer Kochsalzlösung gelöstem ANGII gefüllt. Die Pumprate betrug 0,5 µl pro Stunde bei einem Speichervolumen von 200 µl und einer maximalen Pumpdauer von 14 Tagen. Unter Beachtung der veterinärmedizinischen Leitlinien (Wärmeunterlage während der Operation, Auftragen einer schützenden Augensalbe nach Einleiten der Narkose, Aufwachen unter einer Wärmelampe) wurden die Pumpen unter Isofluran-Inhalationsnarkose (1,6 Vol.% Isofluran in der Raumluft) subkutan im Bereich des Nackens positioniert, die Wunde anschließend mit chirurgischen Nähten versorgt und die Naht mit 2% Xylocainsalbe behandelt.

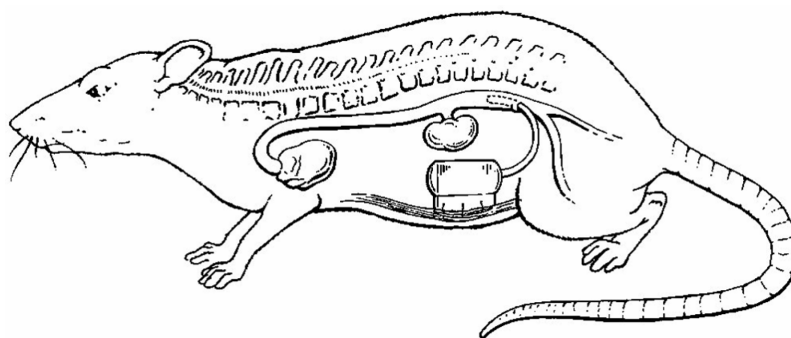
Ziel der ANGII Infusion war, einen stabil erhöhten, mittleren arteriellen Blutdruck<sup>122, 123</sup> in den letzten beiden Dritteln der Schwangerschaft zu erhalten, vergleichbar mit der Blutdruckerhöhung in der PE+ Gruppe. Die Findung der ANGII Dosis gestaltete sich schwierig, da ANGII vorrangig männlichen Versuchstieren appliziert wurde. Da während der unauffälligen humanen Schwangerschaft<sup>67</sup> wie auch während der Rattenschwangerschaft<sup>124</sup> eine östrogenabhängige ANGII Resistenz beschrieben ist, wurde mit einer bei Männchen eingesetzten relativ hohen Dosis von 435 ng/kg/min ANGII<sup>123, 125</sup> begonnen und nach Auswertung der Ergebnisse beschlossen, die Infusionsrate auf 1 µg/kg/min etwas mehr als zu verdoppeln. Ausschlaggebend für diese Erhöhung der ANGII Konzentration war der

instabile, nicht signifikante Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks unter Gabe von 435 ng/kg/min ANGII. Am Mausmodell wurde diese hohe ANGII Konzentration, die sich als nicht letal erwies, bereits angewendet.<sup>126, 127</sup>

### 5.1.6 Telemetrie

Mittels Telemetrie kann der zirkadiane Verlauf von Blutdruck und Herzfrequenz sowie die motorische Aktivität am wachen Kleintier gemessen werden. Dabei besteht das Telemetriesystem aus einem Transmitter inklusive Katheter, einem Empfänger und dem Erfassungssystem. Der Katheter des Transmitters wird gegen den Blutstrom gerichtet im Blutgefäß platziert; der relative Druck wird über eine Flüssigkeitssäule im Katheter auf den Transmitter übertragen.

Der Transmitter wurde unter Inhalationsnarkose mit Isofluran (1,6 Vol.% Isofluran in der Raumluft) implantiert. Dazu wurde im Bauchbereich ein kleiner Schnitt gesetzt und die *Aorta abdominalis* für circa 10 Sekunden abgedrückt, während der Katheter des Transmitters *infrarenal* in die *Aorta abdominalis* eingeführt und mit Wundkleber befestigt wurde. Nach Verschluss der Wundstelle im Gefäß mit Wundkleber und der Befestigung des Transmitters mittels einer chirurgischen Naht am *Peritoneum* wurde der Bauchraum mit Klammern verschlossen. Zur Schmerzbehandlung wurde die Naht mit 2% Xylocainsalbe bestrichen (s. Abb. 9). Nach strikter Einhaltung einer 10 Tage währenden Ruhezeit begann die kontinuierliche Datenaufzeichnung, indem die Tiere in ihren Käfigen über spezielle Empfänger positioniert wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Dataquest-Programm. Die relativen Druckwerte aus dem Blutgefäß wurden um den aktuellen Luftdruck korrigiert.



**Abbildung 9. Transmitterpositionierung im Tier**

Die Implantation des Transmitters sowie die anschließende Datenerfassung hatten nachweislich keinen Einfluss auf Fruchtbarkeit der Mutter und Embryo- beziehungsweise Fötalentwicklung, wie an weiblichen Ratten getestet. Auch die physiologische Reaktion auf eine Angiotensin II Infusion war unverändert zur Kontrollgruppe ohne telemetrische Datenerfassung.<sup>128</sup>

### 5.1.7 Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte unter standardisierten Bedingungen; es wurde ein im Vorfeld erarbeitetes Protokoll ausgeführt, in welchem die Organgewichte und eventuelle Auffälligkeiten vermerkt wurden.

Die Tiere wurden mit Diethylether narkotisiert, gewogen und unter Zuhilfenahme einer Guillotine getötet.

Zur Plasmagewinnung wurden 2 ml Blut mit 6,25 mM EDTA und  $10^{-6}$  M Aliskiren, einem Reninhemmer, bei 3.000 x g, 4°C 10 Minuten zentrifugiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung von zirkulierendem ANGII wurde zusätzlich 1,25 mM 1,10-Phenantrolin, ein Metallionen-Komplexbildner, zugesetzt, der den Abbau von ANGII *in vitro* hemmt.<sup>129</sup> Ferner wurde Blut zur Serumgewinnung 10 Minuten bei RT stehen gelassen, bei 3.000 x g, RT 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Nachdem Thorax und Abdomen eröffnet wurden, durchtrennte ich die Aorta, spülte das Herz mit warmer 0,9% Kochsalzlösung und überführte das Herz in warme 0,9% Kochsalzlösung. Nach Entfernung der Vorhöfe wurden beide Ventrikel gewogen, die Herzspitze für die Isolierung von RNA in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und der Rest einerseits in 4% neutral gepufferter Formalinlösung für Paraffinschnitte fixiert, andererseits bei -40°C in Isopentan gekühlt und auf Trockeneis eingefroren für Kryoschnitte.

Die Nieren wurden entnommen, von der Nierenkapsel befreit und gewogen. Von jedem Nierenpaar wurde ein Teil für die Isolierung von RNA sowie für Paraffin- und Kryoschnitte konserviert.

Beide Uterushörner wurden eröffnet, die Implantationsstellen auf das Protokoll übertragen und durchnummeriert. Nach Eröffnen der Fruchtblase wurde der Fötus gewogen, geköpft und das Gewicht seiner Leber, seiner Nieren, seines Herzens und des Hirns bestimmt. Die Organe wurden in flüssigem Stickstoff kryokonserviert beziehungsweise in 4% neutral gepufferter Formalinlösung fixiert. Die uteroplazentare Einheit, bestehend aus Plazenta und mesometrialem Dreieck, wurde präpariert, gewogen, für RNA-Expressionsanalysen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und für Kryo- beziehungsweise Paraffinschnitte konserviert (s. Abb. 10).



**Abbildung 10. Fötus mit uteroplazentarer Einheit**

Ein 21 Tage alter, lebensfähiger Fötus, der über die Nabelschnur mit der uteroplazentaren Einheit, bestehend aus der Plazenta und dem aufgesetzten mesometrialen Dreieck, verbunden ist.

Für die Elektronenmikroskopie wurde das Protokoll wie folgend leicht abgewandelt: Der Bauchraum der Ratten wurde unter Isofluran-Inhalationsnarkose (1,6 Vol.% Isofluran in der Raumluft) eröffnet, um mit einer scharfen Rasierklinge ein 3 mm x 3 mm großes Stück Nierenrinde zu entnehmen, welches sofort in 4°C kaltes Glutaraldehyd überführt wurde. Durch zervikale Dyslokation wurde das Tier anschließend getötet.

Für immunhistologische Untersuchungen der uteroplazentaren Einheit wurde diese entweder im Fixativ nach Beckstead<sup>130</sup> oder in Paraformaldehyd für 24 Stunden fixiert, zweifach mit destilliertem Wasser gewaschen und in 70% Ethanol gelagert.

Glutaraldehyd:	3% Glutaraldehyd 0,1 M Kakodylatpuffer pH 7,3
Fixativ nach Beckstead:	0,05% Kalziumacetat 0,5% Zinkacetat 0,5% Zinkchlorid 0,1 M Tris pH 6,8
Paraformaldehyd:	4% Paraformaldehyd 0,1 M Phosphatpuffer (Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat) pH 7,2

## 5.2 Zellbiologische Methoden

### 5.2.1 Wahl der ANGII Dosierung

In humanem Plasma 4 männlicher und 3 weiblicher gesunder Probanden wird eine ANGII Konzentration von  $88 \pm 12,3$  pg/ml gefunden.<sup>131</sup> Die ANGII Konzentration in Chorionzotten normaler Plazenten beträgt  $15 \pm 2$  fmol/mg und ist bei Präeklampsie erhöht auf  $28 \pm 6$  fmol/mg.<sup>75</sup> Im Plasma weiblicher nicht schwangerer Ratten konnten  $24,9 \pm 2$  pM ANGII nachgewiesen werden während am 19. Schwangerschaftstag  $19,6 \pm 1,6$  pM ANGII gefunden wurden.<sup>79</sup> Entsprechend der physiologischen ANGII Konzentration in humanem Plasma

wurden im in vitro Invasionsexperiment einmalig  $10^{-10}$  bis  $10^{-12}$  M ANGII über einen Wirkdauer von 6 Tagen getestet.<sup>104</sup> *Explant*-Kulturen wurden über 1-2 Tage mit  $10^{-6}$  M ANGII behandelt,<sup>132</sup> die Invasion wurde über 24 Stunden bei einer ANGII Konzentration von  $10^{-7}$  M untersucht<sup>77</sup> und BeWo Zellen wurden mit  $10^{-8}$  M für 6 oder 24 Stunden<sup>103</sup> sowie  $10^{-5}$  bis  $10^{-9}$  M ANGII für 24 Stunden stimuliert.<sup>102</sup>

Für die in dieser Doktorarbeit durchgeführten Zellkulturexperimente wurde ANGII in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M eingesetzt.

### 5.2.2 *Explant*-Kulturen aus der Plazenta, Migrationsassay

*Explant*-Kultivierung ist eine Methode, bei der ein Stück Gewebe mit dem Ziel der Zellgewinnung kultiviert wird. Dies erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Berthold Huppertz, Medizinische Universität in Graz, Österreich, der in Absprache mit der lokalen Ethikkommission *explant*-Kulturen der Plazenta aus im ersten Schwangerschaftsdrittel terminierten humanen Schwangerschaften gewinnt.

Das Abortmaterial wurde sofort in isotonischer Kochsalzlösung gewaschen, in DMEM/Ham's F12 komplettiert mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin bei RT ins Labor transportiert und dort in Ringerlösung überführt. Es wurden Tertiärzotten mit einem Feuchtgewicht von circa 6 mg geschnitten, mit einer Transferpipette in frische Ringerlösung überführt und auf eine mit 10 µg/cm<sup>2</sup> Kollagen beschichtete 24-well-Platte gesetzt. Nach 1 Stunde waren die *explant*-Kulturen angewachsen und 500 µl DMEM/Ham's F10 mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10% *fetal calf serum* (FCS) und 2 mM L-Glutamin wurden hinzugefügt.<sup>109</sup>

Die *explant*-Kulturen wurden nach 48 Stunden Kultivierung auf Mangelmedium mit 0,5% FCS gesetzt und für 72 Stunden mit  $10^{-8}$  M ANGII beziehungsweise  $10^{-6}$  M ANGII stimuliert. Im Anschluss wurden angewachsene *explant*-Kulturen mit ausgewanderten extravillösen Trophoblasten fotografiert, in PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und für immunhistochemische Experimente in 4% neutral gepuffertem Formalin fixiert. Die Migrationsfläche wurde mithilfe des Programms Image J bestimmt.<sup>109</sup>

### 5.2.3 SGHPL4 Zelllinie, Kultivierung und Kryokultivierung

Durch Transfektion humaner, primärer, extravillöser Trophoblasten mit dem SV40 Promotor wurde die SGHPL4 (PL4) Zelllinie in der Arbeitsgruppe Professor Dr. Guy Whitley/Dr. Judith Cartwright, St. George's University in London, UK, generiert. Aufgrund der Expression von HLA-G, CD 9, humanem Choriongonadotropin und Cytokeratin 7 teilt sie viele Eigenschaften ihrer Ursprungszellen und wird als extravillöse Trophoblastenzelllinie eingesetzt.

PL4 Zellen wachsen adhärent und werden in Ham's F10 Nährlösung, angereichert mit 10% *FCS* im Vollmedium beziehungsweise 0,5% *FCS* im Mangelmedium, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin in begasten Inkubatoren (37°C, 5% Kohlendioxid) kultiviert. In der Regel wurden die Zellen zweimal wöchentlich bei circa 90% Konfluenz durch einmaliges Waschen mit *PBS* und fünfminütiger Inkubation bei 37°C mit Trypsin-EDTA passagiert. In Abhängigkeit von der Versuchsplanung wurden die Zellen nach erfolgter Zentrifugation (300 x g, 4°C, 5 Minuten) gründlich mit Medium resuspendiert, in der Neubauer Zählkammer nach Trypanblaufärbung ausgezählt und erneut ausgesät. PL4 Zellen wurden zwischen der 16. und der 22. Passage verwendet.<sup>113, 133</sup>

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen in Suspension gebracht, pelletiert und in Medium mit 20% *FCS* und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -80°C tiefgefroren. Tiefgefrorene Zellen wurden zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in Vollmedium überführt, pelletiert und in Vollmedium ausgesät.

#### 5.2.4 Mobilitätsassay

PL4 Zellen ( $3 \times 10^4$  Zellen pro well einer 12-well-Platte) wurden in 1 ml Vollmedium für 24 Stunden kultiviert; danach wurde das Medium aspiriert und durch 1 ml Mangelmedium mit 0,5% *FCS* für weitere 24 Stunden ersetzt. Um die Mobilität der Zellen als Antwort auf die eingesetzten Stimuli zu untersuchen, wurden die Zellen 1 ml Mangelmedium mit  $10^{-8}$  M ANGII,  $10^{-6}$  M ANGII, 1 µM des AT1-R Blockers Losartan oder 10 ng/ml *epidermal growth factor* (EGF) als Positivkontrolle ausgesetzt. Sofort nach Stimulation überführte ich die Zellen in die auf 37°C beheizte und mit 5% CO<sub>2</sub> belüftete Kammer des IX-70 *time-laps* Phasenkontrastmikroskops, in welcher automatisch alle 15 Minuten über 6 Stunden hinweg Fotos aufgenommen wurden, sodass nach dieser Periode 20 Zellen pro Foto zufällig ausgewählt und deren zurückgelegte Wegstrecke über 6 Stunden nachvollzogen werden konnte. Für die Quantifizierung wurde das Programm Image Pro-Plus herangezogen.<sup>133, 134</sup>

#### 5.2.5 Invasionsassay

Um die Fähigkeit von Trophoblasten (PL4 Zellen) zu untersuchen, sich in einer dreidimensionalen Matrix bewegen zu können, wurden Invasionsexperimente durchgeführt.<sup>134, 135</sup>

0,1 g mit Gelatine überzogene Cytodex-3 *microcarrier* Kügelchen wurden dem Beipackzettel entsprechend in 10 ml PBS gelöst und autoklaviert.  $1 \times 10^6$ /ml resuspendierte Zellen wurden mit 200 µl Kügelchen (2 mg) vermischt, gefolgt von einer Volumenerhöhung mit Medium auf 5 ml. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 75 Minuten, die lediglich zum vorsichtigen Resuspendieren der Kügelchen-Zell Mischung unterbrochen wurde, um den Zellen Zeit zu

geben, sich auf der Oberfläche der Kügelchen festzusetzen. Um freischwimmende Zellen auszuwaschen, wurde anschließend dreimal vorsichtig mit *PBS* gespült.

Durch das Auflösen von Rinderfibrinogen in *PBS* (2,5 mg/ml) und dem Hinzufügen von 200 U/ml Aprotinin wurde das Fibrinogelgel bereit, welches durch eine 0,2 µm Membran sterilfiltriert wurde. Die mit PL4 Zellen bewachsenen Kügelchen wurden mit 15 ml Fibrinogelgel vermischt. Durch Zugabe von 0,625 U/ml Thrombin polymerisierte das Gels aus. 1,5 ml Fibrinogel mit den zellbewachsenen Kügelchen wurden in eine Vertiefung einer 6-*well*-Platte pipettiert und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1 ml Mangelmedium hinzugefügt und den Zellen erlaubt, für 24 Stunden zu ruhen.

In 1,5 ml Mangelmedium wurden  $10^{-8}$  M ANGII,  $10^{-6}$  M ANGII, 1µM Losartan und 10 ng/ml *EGF* als Positivkontrolle in doppelten Ansätzen getestet. Nach 48 Stunden wurden 20 Kügelchen/Ansatz per Zufall ausgewählt und mit einem IX-70 *time-laps* Phasenkontrastmikroskop fotografiert, um sowohl die Anzahl der ins Fibrinogel ausgewanderten Zellen zu bestimmen als auch die Länge der zurückgelegten Wegstrecke im Gel. Dabei wurde die Image Pro-Plus Software benutzt.

#### 5.2.6 Apoptoseassay

Nach einer Ruhezeit von 24 Stunden wurden zu  $3 \times 10^4$  PL4 Zellen pro *well* einer 12-*well*-Zellkulturplatte 1,5 ml Mangelmedium und folgende Stimuli gegeben: Die Apoptose wurde einerseits extrinsisch ausgelöst durch den an den Todesrezeptor bindenden Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) beziehungsweise in Kombination mit dem intrinsischen Weg, der durch Actinomycin D, einem zytotoxischen Antibiotikum, welches in die DNA interkaliert, aktiviert wird.  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M ANGII wurden sowohl hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Apoptose zu induzieren als auch die durch oben beschriebene Stimuli ausgelöste Apoptose zu verhindern, untersucht. Das Geschehen auf der Zellkulturplatte wurde in der mit 5% CO<sub>2</sub> belüfteten und auf 37°C erwärmten Kammer der IX-70 *time-laps* Phasenkontrastmikroskopes beobachtet. Dazu wurden alle 15 Minuten über 24 Stunden hinweg *time-laps* Sequenzen aufgenommen, die anschließend mit dem Programm Image Pro-Plus analysiert wurden. Per Zufall wurden 20 Zellen pro Ansatz ausgesucht und der Zeitpunkt, zu welchem die Zelle erstmalig apoptotische Merkmale, wie Zytoplasmaschrumpfen, Membranbläschen, Zellkernschrumpfung und *phase-bright appearance* zeigte, wurde vermerkt.<sup>134, 136</sup>

### 5.3 Molekulargenetische Methoden

#### 5.3.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolierung erfolgte unter zu Hilfenahme des QIAzol Lysepuffers, einer monophasischen Phenol- und Guanidinthiocyanatlösung, und des RNeasy® Mini Kits. Bei

einer RNA-Isolierung werden zunächst die Gewebe homogenisiert und die Zellen lysiert, die RNasen inaktiviert und schließlich wird die RNA extrahiert. So erhält man ein Gemisch aus ribosomaler RNA, Transfer-RNA und circa 2% Boten-RNA (mRNA).

5–10 mm<sup>3</sup> große Gewebestücken wurden mit 700 µl QIAzol Lysepuffer, dem 10 µl/ml der Disulfidreduktase 2-Mercaptoethanol zugesetzt waren, und 6 2,8 mm große Keramikkügelchen für 2x 15 Sekunden bei 5.500 rpm im precellys-Homogenisator homogenisiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Es wurden 150 µl Chloroform hinzugefügt, 15 Sekunden intensiv gemischt und erneut 3 Minuten bei RT inkubiert. 15 Minuten Zentrifugation bei 4°C, 12.000 x g führte zur Trennung der oberen, wässrigen, RNA-haltigen Phase von der unteren, organischen Phenol-Chloroform Phase und einer Interphase mit denaturierten Proteinen. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und mit einer Volumeneinheit 70% Ethanol versetzt, wodurch die RNA präzipitierte. Bis zu 700 µl dieses Gemischs wurden auf die RNeasy® Mini Säule geladen und bei 8.000 x g für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, während die RNA und eventuell auch Teile der DNA an die Silikate der Säulenmatrix gebunden wurden. Das Waschen der Säule erfolgte mit 350 µl RNeasy® RW1 Puffer.

Auf der gereinigten Säulenmatrix wurden verbliebene Reste genomischer DNA mittels eines DNase Verdaus entfernt. Dazu wurden pro Säule 10 µl DNase und 70 µl RDD Puffer des RNase freien DNase Sets verwendet und 15 Minuten bei RT inkubiert. Durch erneute Zugabe von RW1 Puffer und Abzentrifugation wurden die DNase und die verdaute DNA von der Säulenmatrix gewaschen.

Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE-Puffer/Ethanol und anschließender Zentrifugation bei 17.900 x g und RT für 15 Sekunden bzw. 2 Minuten zum Trocknen der Membran, wobei der Durchfluss jeweils verworfen wurde. Eluiert wurde die RNA mit 30 µl RNA-, DNA-, DNase- und RNase-freiem Wasser bei 12.900 x g, 25°C und 1 Minute.

### 5.3.2 Bestimmung der RNA Quantität und Qualität

Für die Untersuchung der RNA kam das NanoDrop® 1.000 Spectrophotometer zum Einsatz, dessen Vorteile in der Genauigkeit der Messung (eine Verdünnung der Proben ist nicht notwendig) und in dem Minimalvolumen von 1 - 1,5 µl, das für die Messung aufgewandt werden muss, liegen.

Sowohl zur Initialisierung des Gerätes als auch zum Festlegen des Blankwertes wurden 1 µl Wasser auf die Linse des Spectrophotometers aufgetragen. Die Messung der RNA-Konzentration (in ng/µl) erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Auch die Qualitätswerte 260/280 und 260/230 wurden mit dem NanoDrop® für jede Probe gemessen. Das Absorptionsverhältnis 260/280 sollte für reine RNA gegen den Wert 2,0



gehen und ist geringer, wenn die untersuchte Probe mit Proteinen verunreinigt ist. Das optimale Absorptionsverhältnis 260/230 liegt zwischen 2,0 und 2,2, wobei geringere Werte auf die Anwesenheit von Verunreinigungen wie Phenol hinweisen.

### 5.3.3 cDNA Synthese

Um aus einer RNA-Matrize einzelsträngige cDNA zu erhalten, musste eine reverse Transkription durchgeführt werden. Da die gesamt-RNA umgeschrieben werden sollte, wurde als Primer der aus kurzen Oligonukleotiden bestehende Random-Primer (Randomhexamere) ausgewählt. Random-Primer sind 6 bp lange Oligonukleotide, die alle möglichen Kombinationen der vier Basen enthalten. Durch die mehrfache Bindung an komplementäre Stellen der RNA durch Hexamere wird gewährleistet, dass einzelne Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) die Lücken auffüllen und das freie OH-Ende der Random-Primer Startpunkt der Reversen Transkriptase für die Polymerisationsreaktion ist. Zur Anwendung kam das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; es wurde wie in Tabelle 1 und 2 dargestellt vorgegangen:

**Tabelle 1. Pipettierschema cDNA Synthese**

RNA Probe	2 µg in 10 µl
10x RT Puffer	2 µl
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10x RT Random-Primer	2,0 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1,0 µl
RNase Inhibitor	1 µl
Nuklease-freies Wasser	3,2 µl

**Tabelle 2. PCR Bedingungen cDNA Synthese**

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25°C	37°C	85°C	4°C
Zeit	10 min	120 min	5 min	unendlich

### 5.3.4 Primer- und Sondendesign

Unter Nutzung des Programms Primer Express® konnten die verwendeten Primer- und Sondensequenzen bestimmt werden, die dementsprechend von der Firma BioTez, Berlin Buch, synthetisiert wurden. Es wurde versucht, das Primerpaar oder die Sonde Exon-überspannend zu generieren, um das Erkennen von genomischer DNA auszuschließen.

**Tabelle 3. Primer- und Sondensequenzen**

Für die quantitative RT-PCR wurden in 5'-3'-Richtung angegebene Primer und Sonden benutzt, die mit dem Primer Express® Programm ausgewählt und von BioTez synthetisiert wurden. (A) Desoxyadenosintriphosphat, (G) Desoxyguanosintriphosphat, (C) Desoxycytosintriphosphat, (T) Desoxythymidintriphosphat

	<b>Vorwärtsprimer 5' - 3'</b>	<b>Rückwärtsprimer 5' - 3'</b>	<b>Sonde 5' FAM - 3' TAMRA</b>
<b>18 S</b>	ACATCCAAGGAAG GCAGCAG	TTTTCGTCACCT CCCCG	CGCGCAAATTACCCACTCC CGAC
<b>AGT</b>	CTTCACTGAGAGC GCCTGC	GAGACCCTCCACCTT GTCCA	CTGATCCAGCCTCACTATG CCTCTGACC
<b>ANP</b>	CCATCACCAAGGG CTTCTTC	ACGGGATTTGCTCCA ATATG	TCCTGGCCTTTTGGCTCCC AG
<b>BNP</b>	CAAGCTGCTTTGG GCAGAAG	AAACAACCTCAGCCCG TCAC	AGACCGGATCGGCGCAGTCAG TCGCTT
<b>CTGF</b>	CGCCAACCGCAAG ATTG	CACGGACCCACCGA AGAC	CACTGCCAAAGATGGTGCA CCCTG
<b>Fibronectin</b>	GGACCTGCAAGCC AATAGCT	TCCCCACGACGTAG GAA	AGAAATGTTTTGATCAGCT GCTG
<b>Kollagen 1</b>	AGAGCGGAGAGTA CTGGATCGA	CTGACCTGTCTCCAT GTTGCA	CAAGGCTGCAACCTGGATG CCATC
<b>NGAL</b>	TCG TCA GCT TTG CCA AGT	TTG GTC GGT GGG AAC AGA	TGG GCC TCA AGG ATA ACA ACA TCG TTT
<b>Renin</b>	CAGGGACAGTCAG TGGCTTTC	ACATCTGTGTCACCG TGATTCC	AGCCAGGACATCATCACCG TGGG

### 5.3.5 Quantitative real time-PCR

Eine der Methoden zur Quantifizierung von Nukleinsäuren ist die quantitative *real time*-Polymerasekettenreaktion. Hierbei erfolgt anders als bei den herkömmlichen RNA-Analysen (z.B. Northern Blot) die Quantifizierung nicht nach, sondern während der Amplifikation. Dies ist eine enorme Zeit- und Aufwandsersparnis.

Grundlage für die heute angewandte quantitative *real time*-PCR nach dem TaqMan-Prinzip<sup>137</sup> ist die Ausstattung der PCR-Maschine mit einer Halogen-Lampe und einer CCD-Kamera<sup>138</sup> sowie die Verwendung spezifischer, fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide und Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer<sup>139</sup> (FRET). Das Oligonukleotid ist eine spezielle fluorogene Sonde, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und mit einem Phosphatrest blockiert ist. Der hier verwendete Reporterfarbstoff 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) wird bei einer Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt. Diese Fluoreszenz wird bei einer gewissen Nähe zum Quencher-Farbstoff 6-Carboxy-tetramethyl-Rhodamin (TAMRA) durch den FRET unterdrückt. Diese räumliche Nähe ist bei der intakten Sonde gegeben. Trifft während der Amplifikation die Taq Polymerase auf die an der cDNA hybridisierte Sonde, wird diese durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Taq Polymerase hydrolysiert. Dadurch wird die räumliche Nähe vom Reporter- zum Quencher-Farbstoff unterbrochen und es kommt zu einem Fluoreszenzsignal. Dieses Signal wird detektiert und ist durch die hohe Spezifität der Primer

und der Sonde sequenzspezifisch. Der Anstieg der Fluoreszenz ist während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion der Amplifikation direkt proportional und kann somit zur Quantifizierung genutzt werden.

Störende Fluktuationen der Fluoreszenz werden mit Hilfe des dem Reaktionspuffer zugesetzten passiven Referenzfarbstoff 6-Carboxy-X-rhodamin ausgeglichen. Das normalisierte Reportersignal  $R_n$  entspricht dem Quotienten der Emissions-Intensität des Reporter-Farbstoffes dividiert durch die Emissions-Intensität des passiven Referenzfarbstoffes.

Alle Bestimmungen erfolgten als Triplikate. Die Standardreihe bestand aus 5 Verdünnungen. Bei jeder PCR-Reaktion wurde eine Negativkontrolle (*non template control*, NTC) mitgeführt, bei der die cDNA durch Wasser ersetzt wurde (s. Abb. 11).

variable Parameter zur MM Berechnung:				
Anzahl der Proben	23.0			
Anzahl der rxns pro Proben-Submastermix	3.2	rxns		
Anzahl der Standards	5.0			
Anzahl der rxns pro Standard-Submastermix	3.2	rxns		
Anzahl der rxns pro NTC Submastermix	3.5	rxns		
Anzahl der Reaktionen insgesamt	94.6	rxns		
Volumen pro Reaktion	25.0	µl		
cDNA Volumen pro Reaktio	10 ng / µl	1.00	µl	
FP forward primer	10.0	µM		
RP reverse primer	10.0	µM		
S Sonde	5.0	µM		

optimale End-Konzentration	
FP [ ] in nM	300
RP [ ] in nM	300
S [ ] in nM	150

TaqMan Universal MasterMix (uMM) P/N 4304447 for 200 rxn, store @ 4°C

Reagenzien	Konzentration der Stammlösungen	End-Konzentration	µl pro 1 rxn	µl pro 94.6 rxns	Reagenzien
2 x uni MM Buffer	2 x	1 x	12.50	1182.50	2 x uni MM Buffer
FP Forward Primer	10	300	0.75	70.95	FP Forward Primer
RP Reverse Primer	10	300	0.75	70.95	RP Reverse Primer
S Sonde	5	150	0.75	70.95	S Sonde
RNA (convertiert zu cDNA)	10 ng / µl	10ng/Ansatz	1.00	94.60	Template, add later
Wasser			9.25	875.05	Wasser
Gesamtvolumen µl			25.00	2365.00	Gesamtvolumen µl

**Abbildung 11. Pipettierschema der quantitativen *real time*-PCR**

Die PCR-Bedingungen für die cDNA-Amplifikation unter Verwendung des TaqMan Fast Universal PCR-Mastermix (2×) für das 7.500 Fast System sind folgende (s. Tab. 4):

**Tabelle 4. Quantitative *real time*-PCR Bedingungen**

Zeiten und Temperaturen		
einleitende Schritte	PCR (45 Zyklen)	
Denaturierung	Schmelzen	Primeranlagerung/Polymerisierung
10 min 95°C	3 s 95°C	30 s 60°C

Neben der genspezifischen Primer/Sonden-Paarung wurde ein zweiter Ansatz erstellt, der eine Primer/Sonden-Paarung enthielt, welche spezifisch an das *housekeeping* Gen 18 S hybridisiert. Somit konnte die Expression des Zielgens auf die Expression des zwischen den Proben invariablen *housekeeping* Gens normalisiert werden. Um die Ergebnisse entsprechend darstellen zu können, mussten die Daten in die relative Expression umgerechnet werden. Hierzu wurde die gemittelte Menge der Probe durch die gemittelte Menge des *housekeeping* Gens dividiert.<sup>140</sup>

## 5.4 Proteinanalytische Methoden

### 5.4.1 Albumin ELISA

Der verwendete Albumin Festphasen-Enzymimmunoassay Kit beinhaltet einen direkten, kompetitiven Test zur Bestimmung von Ratten-Albumin im Harn.

An die Kavitäten der Mikrotiterplatte ist Ratten-Albumin gebunden. Während der zweistündigen Inkubation bei RT wurde die Bindung des mit Peroxidase markierten Albumin-Antikörpers an die Platte durch das in der Probe befindliche Albumin kompetitiv gehemmt. Durch Waschen der Platte wurde nach Abschluss der Immunreaktion der nicht an der Platte gebundene Anteil des Ratten-Albumin-Antikörpers entfernt. Da der Antikörper mit Peroxidase markiert war, konnte der gebundene Anteil mittels einer Substrat-Chromogen-Lösung quantifiziert werden. Die Zugabe 0,5 M Schwefelsäure stoppte die Reaktion ab und führte zum Farbumschlag von blau nach gelb. Die im Photometer bei 450 nm gemessene Absorption ist umgekehrt proportional zur Albuminkonzentration in der Probe und wurde über eine Standardkurve quantifiziert. Man erhält die Albuminkonzentrationen der Proben in mg/ml bzw. durch Multiplikation mit dem Urinvolumen die ausgeschiedene Albuminmenge in mg/d.

### 5.4.2 Immunhistochemie

#### 5.4.2.1 Apoptosefärbung

Caspasen sind Proteasen, die Peptidbindungen ihrer Zielmoleküle carboxyterminal von Aspartat spalten. Sie sind die wichtigsten Enzyme der Apoptose, da sie selbst aktiv am Abbau von Lamin und Aktin beteiligt sind, aber auch sekundäre Zielproteine wie Nukleasen oder weitere Caspasen aktivieren. Die Aktivierung des inaktiven Caspase 3 Zymogens erfordert die proteolytische Spaltung in ein 17 kDa und ein 12 kDa großes Fragment, ausgelöst durch Initiatorcaspasen, deren Aktivierung wiederum extrinsische oder intrinsische pro-apoptotische Signale vorausgehen. Der verwendete Antikörper detektiert ausschließlich das 17 kDa Fragment der aktivierten (*cleaved*) Caspase 3.

In 4% neutral gepuffertem Formalin, welches Proteine durch die Ausbildung Schiff'scher Basen und Methylenbrücken vernetzt, fixierte humane *explant*-Kulturen wurden 48 Stunden in Sörensenpuffer gespült und anschließend über eine aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 4x 70%, 2x 96%, 2x 100% für jeweils 45 Minuten) dehydriert. Nach zweifacher Inkubation in Toluol, welches als Lösungsmittel den absoluten Alkohol aus der Probe entfernt, für jeweils 1,5 Stunden wurden die *explant*-Kulturen in zwei Schritten von jeweils 2 Stunden in 56°C warmes Paraffin eingelegt und danach in Einbettkassetten mit Paraffin eingebettet. Von Paraffinblöcken wurden mithilfe eines Rotationsmikrotoms Serienschnitte (5 µm) angefertigt, bei 50°C für 3 Stunden getrocknet und anschließend bei RT aufbewahrt.

Das Paraffin der Gewebeschnitte wurde in Histo-Clear® (3x 5 Minuten) entfernt und die Schnitte in der absteigenden Ethanolreihe (3x 3 Minuten 100%, 2x 2 Minuten 96%, 1x 1 Minute 70%) bis zum destillierten Wasser hydratisiert. Mit einem wasserabweisendem PAP Stift wurde ein hydrophober Ring um den Schnitt auf dem Objektträger gezogen, der dafür sorgt, dass die im Weiteren aufgetragenen Reagenzien auf dem Schnitt verbleiben und somit die Menge der benötigten Reagenzien minimal hält. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten in einer feuchten Kammer, die das Austrocknen des Schnittes verhindert. Zur Epitop- beziehungsweise Antigen-Demaskierung wurde 0,1% Trypsin für 15 Minuten bei 37°C und weitere 15 Minuten bei RT aufgebracht. Nach 3x 5 Minuten Waschen in *TBS* (*tris buffered saline*) *high salt* wurde 30 Minuten mit 10% Eselserum geblockt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu minimieren. Der erste Antikörper (Anti-cCaspase 3) wurde 1:100 mit *TBS* verdünnt, pro Schnitt wurden 50 µl Antikörperversdünnung für 60 Minuten bei RT aufgetragen. Nach 3x 5 Minuten Waschen in *TBS high salt* wurde der mit Cy 3 markierte zweite Antikörper (Anti-IgG) appliziert. 50 µl einer 1:500 Verdünnung mit *TBS* wurden für 60 Minuten bei RT eingesetzt. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mit Vectashield® Mounting Medium mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) eingedeckt, wobei DAPI Nukleinsäuren anfärbt.

Als Positivkontrolle wurden humane Rektumkarzinomschnitte der oben beschriebenen Prozedur unterzogen. Ebenso wurde eine Negativkontrolle ohne 1. Antikörper mitgeführt, um unspezifische Signale des 2. Antikörper auszuschließen.

Die Auswertung erfolgte geblindet am Axioplan-2 Imaging Mikroskop unter Verwendung des Programms AxioVision 4.6.

Sörensenpuffer:	80 mM Kaliumdihydrogenphosphat 320 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat pH 6,1
<i>TBS, high salt:</i>	500 mM Natriumchlorid 50 mM Tris-HCl pH 7,6
<i>TBS:</i>	150 mM Natriumchlorid

50 mM Tris-HCl  
pH 7,6

#### 5.4.2.2 Proliferationsfärbung

Als nukleäres Protein wird Ki-67 während aller aktiven Phasen des Zellzyklus (G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase) exprimiert, fehlt aber in ruhenden Zellen (G<sub>0</sub>-Phase). Es wird schnell abgebaut, wenn die Zelle in den nicht-proliferativen Zustand übergeht, während DNA-Reparaturprozessen scheint es nicht exprimiert zu werden. Ki-67 ist als zellulärer Marker proliferierender Zellen stark verbreitet.

Fixierung, Dehydrierung, Einbettung in Paraffin und Anfertigen der Parallelschnitte erfolgten nach beschriebener Methode ebenso wie das Entparaffinieren und die Rehydrierung der Schnitte. Zur Epitop-Demaskierung wurden die Schnitte mit Citratpuffer nach folgendem Programm in der Mikrowelle behandelt: 8 Minuten 750 Watt, 2 Minuten Ruhezeit, 8 Minuten 750 Watt, auf Eis abkühlen und mit destilliertem Wasser waschen. Der PAP Stift kam zum Einsatz. Die Kernmembran wurde für 30 Minuten bei RT mit 2% Saponin permeiert. Es schlossen sich 3x 5 Minuten Waschen mit *TBS high salt* und 30 Minuten Inkubation mit 10% Eselserum an. Der erste Antikörper (Anti-Ki-67) wurde 1:100 mit *TBS* verdünnt, davon wurden 50 µl für 1 Stunde bei RT eingesetzt. Ungebundener erster Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit *TBS* entfernt. Der mit Cy3 markierte 2. Antikörper (Anti-IgG) wurde 1:500 mit *TBS* verdünnt und 1 Stunde bei RT eingesetzt. Es wurde erneut gewaschen und mit Vectashield® Mounting Medium mit DAPI eingedeckt.

Citratpuffer: 10 mM Zitronensäure  
pH 6,0

#### 5.4.2.3 *sirius red* Färbung

*Sirius red* ist ein anionischer Farbstoff, der aufgrund seiner Sulfonsäuregruppen basische Gruppen im Kollagenmolekül anfärbt. Durch Hellfeldmikroskopie erscheinen Kollagenfasern vor dem hellgelben Zytoplasma rot. Zellbestandteile wie Kollagen 4 oder Keratohyalin granula, werden ebenfalls durch *sirius red* angefärbt. Allein Kollagen 1 erscheint in polarisiertem Licht doppelbrechend und kann damit exklusiv nachgewiesen werden.

Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Schnitte wurden 2x 5 Minuten in Xylol entparaffiniert, rehydriert durch Durchlaufen einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96%, 80%, 70% für je 5 Minuten), in destilliertem Wasser gespült, 60 Minuten mit *sirius red* im Dunkeln inkubiert, mit 0,005% Essigwasser gewaschen, mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe (96%, 3x 100%) und 2x 5 Minuten Xylol dehydriert und eingedeckt mit Eukitt®.

*sirius red*: 0,1% *sirius red* Farbstoff  
gesättigte Pikrinsäure  
Filtrieren, pH 2,0

#### 5.4.2.4 Färbung der uteroplazentaren Einheit

Die Färbungen der uteroplazentaren Einheit erfolgten in Kooperation mit Prof. Dr. Robert Pijnenborg und Dr. Nele Geusens, Katholieke Universiteit in Leuven, Belgien.

Die intakte uteroplazentare Einheit, bestehend aus der Plazenta und dem mesometrialen Dreieck, wurde von der Lagerung in 70% Ethanol ausgehend einer Dehydration mit Ethanol (90%, 4x 100% für je 90 Minuten), gefolgt von Toluol (4x 60 Minuten) unterzogen und in Paraffin eingebettet. Im Abstand von 100 µm wurden je 10 parallele, entsprechend der mesometrial-fötalen Achse geschnittene Sets von jeweils 10 Schnitten angefertigt, wobei die Schnittdicke 3 µm betrug. Für nachfolgend aufgeführte Färbungen wurden die 4 -5 Sets verwendet, in denen der mütterliche arterielle Kanal zu sehen war (s. Tab. 5).

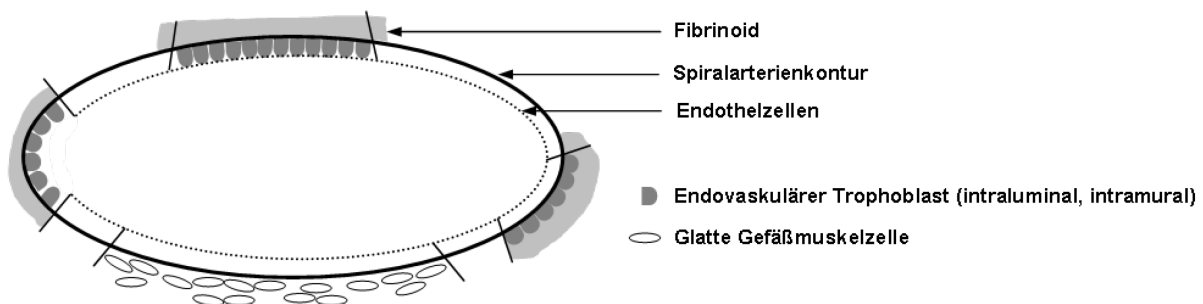
**Tabelle 5. Protokoll für die Färbung der uteroplazentaren Einheit**

	<b>Glatte Gefäßmuskelzellen</b>	<b>Trophoblasten</b>	<b>Endothelzellen</b>
<b>Fixierung</b>	Beckstead Fixativ	4% PFA	Beckstead Fixativ
<b>Blocken der endogenen Peroxidase</b>	0,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 100% Methanol, 30 Minuten	-	-
<b>Blocken der endogenen alkalischen Phosphatase</b>	-	0,2 M HCl, 10 Minuten	0,2 M HCl, 10 Minuten
<b>Waschen / Verdünnen</b>		TBS	
<b>Blocken unspezifischer Bindungen</b>	2% BSA, 0,1% Tween-80, 1% Blockmilch in TBS, 15 Minuten		
<b>1. Antikörper</b>	Anti-α-Aktin 1:200, 120 Minuten, RT	Anti-Cytokeratin 1:500, 4°C, über Nacht	Anti-CD 31 1:200, 4°C, über Nacht
<b>2. Antikörper</b>	Anti-IgG, Peroxidase markiert 1:100, 30 Minuten	Anti-IgG 1:50, 30 Minuten	Anti-IgG 1:50, 30 Minuten
<b>Detektion des 2. Antikörpers</b>	-	APAAP Komplex 1:100, 30 Minuten	APAAP Komplex 1:100, 30 Minuten
<b>Farbreaktion</b>	DAB 10 Minuten	NBT/BCIP 80 Minuten Verdau mit 0,1% α-Amylase, 10 Minuten, 37°C	NBT/BCIP 60 Minuten
<b>Gegenfärbung</b>	Mayer's Hematoxylin	PAS Glycerin	Mayer's Hematoxylin
<b>Eindecken</b>	Depex		Glycerin

Es wurden Übersichtsaufnahmen des mesometrialen Dreiecks angefertigt, die Spiralarterien wurden im gesamten mesometrialen Dreieck identifiziert, ausgezählt und wie folgend untersucht: Die Kontur der Spiralarterienwand wurde ermittelt, indem sie per Hand umfahren,

auf 1 Pixel Dicke (in  $\mu\text{m}^2$ ) skaliert und durch die Pixelbreite ( $\mu\text{m}$ ) geteilt wurde. Die Teile der Arterienwand, in denen glatte Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Fibrinoid und/oder Trophoblasten vorkamen, wurden vermessen und ihre Länge in Beziehung zur Kontur der Spiralarterie gesetzt.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde das mesometriale Dreieck hinsichtlich seiner Entfernung von der Plazenta in drei Bereiche aufgeteilt, wobei Bereich 1 den plazentanahen, Bereich 3 den plazentafernen Teil beschreibt. Die in Bereich 3 identifizierten Spiralarterien wurden gesondert nach oben beschriebener Methode untersucht.



**Abbildung 12. Schema zur Untersuchung der Spiralarterien**

Spiralarterien ab einer Konturlänge von  $140\ \mu\text{m}$  wurden zur Untersuchung herangezogen. Es wurde der Anteil der Arterienwand markiert und vermessen, der Anzeichen von Fibrinoid, intraluminalen oder intramuralen Trophoblasten, Endothelzellen oder glatten Gefäßmuskelzellen zeigte; dieser wurde in Beziehung zur Kontur der Spiralarterie gesetzt.

Die *periodic acid-schiff* (PAS) Färbung wurde zur Detektion von Fibrinoid eingesetzt. Fibrinoid wird im Zuge der Spiralarterientransformation von endovaskulären, besonders von intraluminalen Trophoblasten, in der Spiralarterienwand als Basalmembrankomponente abgelagert. Für die Namensgebung ausschlaggebend war, dass sich Fibrinoid mit einem Antikörper gegen Fibrinogen anfärben ließ. Durch die Perjodsäure werden freie Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate zu Aldehydgruppen oxidiert, die dann mit dem im Schiff-Reagens vorhandenen schwefelsauren Fuchsin rot-violette Komplexe bilden und so im histologischen Bild erscheinen.

Die Schnitte wurden 2x 2 Minuten mit Toluol entparaffiniert, rehydratisiert über eine aufsteigende Ethanolreihe (100%, 96%, 80%, 70% für je 2x 2 Minuten), in destilliertem Wasser gespült und für 15 Minuten in 1% Perjodsäure inkubiert. Nach erneutem Spülen in destilliertem Wasser erfolgte die Färbung mit Schiff's Reagenz für 30 Minuten im Dunkeln, gefolgt von erneutem Waschen, der Gegenfärbung mit Hämatoxylin Delafield und dem Bläuen in Leitungswasser. Die Schnitte wurden dehydratisiert, mit Toluol behandelt und mit Eukitt® eingedeckt.



### 5.4.3 Radioimmunoassay

Beim Radioimmunoassay (RIA) werden die hohe Nachweisempfindlichkeit radioaktiv markierter Substanzen und die extrem hohe Spezifität immunologischer Reaktionen miteinander verknüpft. Eine bekannte Menge des Antigens wird radioaktiv markiert (*tracer*) und mit einer bekannten Menge eines Antikörpers für dieses Antigen vermischt. Als Resultat binden beide Substanzen als Antigen-Antikörper-Komplex aneinander. Dann wird eine Probe mit der unbekannten Menge des Antigens hinzugefügt, sodass das unmarkierte Antigen aus der Probe mit dem markierten Antigen um die Antikörperbindungsstellen konkurriert. Vom Antikörper werden umso weniger radioaktiv markierte Antigene gebunden, je mehr unmarkierte Antigene vorhanden sind. Damit ist der Anteil der Bindungen zwischen radioaktivem Antigen und Antikörper ein Maß für die Konzentration des zu bestimmenden Antigens, wenn der Antikörper nicht zwischen markiertem und unmarkiertem Antigen unterscheiden kann und wenn die Menge an Antikörper so begrenzt ist, dass noch freies markiertes Antigen vorliegt. Ungebundene Antigene werden von den Gebundenen separiert und die Radioaktivität der Antigene gemessen, wobei sich der Wert des markierten Antigens umgekehrt proportional zu dem des unmarkierten Antigens verhält. Über eine Standardkurve kann die Antigenkonzentration in der Probe quantifiziert werden.<sup>141</sup>

#### 5.4.3.1 ANGII im Plasma

Um die ANGII Konzentration im Plasma zu bestimmen, wurden 50 µl Plasma mit 350 µl RIA-Puffer, 100 µl ANGII-Antiserum (1:30.000 Verdünnung) und 100 µl radioaktiv (<sup>125</sup>I) markiertem ANGII-Peptid (40 pg/ml) versetzt und bei 4°C 16-20 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden den Proben 300 µl Dextrankohle zugegeben, erneut 15 Minuten bei RT inkubiert und abschließend bei 3.000 g, 4°C 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Radioaktivität der Kohlepellets, an den freies markiertes sowie unmarkiertes ANGII adsorbiert ist, im Gammazähler gemessen. Es wurden für alle Proben Doppelbestimmungen durchgeführt und bei jedem Radioimmunoassay wurde eine Standardkurve mitgeführt.

RIA Puffer: 0,1 M Tris  
0,325 mM Neomycin  
0,1% BSA  
0,1% Triton-X  
pH 7,4 mit Essigsäure  
Dextrankohle: 4 g Norit A Kohle  
1 g Dextran T70  
0,1 M Tris  
1 mM EDTA  
pH 7,4 mit HCl

#### 5.4.3.2 Aufreinigung der Peptide aus dem Gewebe

Die Aufreinigung der Peptide aus dem Gewebe sowie die RIA Analysen der uteroplazentaren Einheit erfolgten in Kooperation mit Prof. Dr. Brosnihan, Wake Forest University in Winston-Salem, USA.

Tiefgefrorene Plazenten mit mesometrialen Dreiecken wurden in 80% Ethanol/0,1 N HCl in Anwesenheit mehrerer Proteaseinhibitoren homogenisiert und anschließend bei 30.000 g, 4°C 20 Minuten, zentrifugiert. Die Proben wurden über Nacht bei -20°C eingefroren, ohne den Überstand zu verwerfen und am nächsten Tag erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde zu 1% n-Heptafluorbuttersäure (HFBA) gegeben und erneut über Nacht bei -20°C eingefroren, während das Pellet verworfen wurde. Die Aufreinigung erfolgte über mit 0,1% HFBA: 80% Methanol aktivierten und mit 0,1% HFBA gewaschenen Sep-Pak C<sup>18</sup> Säulen. Nachdem die in der Vakuumzentrifuge auf 1 ml eingetrocknete und mit 9 ml 0,1% HFBA versetzte Probe auf die Säule geladen wurde, wurde die Säule zuerst mit 0,1% HFBA, dann mit Wasser gewaschen. Die Elution erfolgte mit 3,3 ml 0,1% HFBA: 80% Methanol, das Eluat wurde in dreigeteilt für die Bestimmung der ANGII, der ANGI und der ANG1-7 Konzentration, der Vakuumzentrifugation unterzogen und bei 4°C gelagert. Die Wiederfindungsrate von markiertem ANGII, das der aufzureinigenden Probe zugesetzt wurde, betrug 68%. Die Proben wurden für diese Wiederfindungsrate korrigiert. Direkt nach der Homogenisierung wurde ein Aliquot für die Proteinbestimmung nach Bradford weggefroren.

Proteaseinhibitoren: 0,44 mM 1,20 ortho-Phenantrolin Monohydrat  
0,12 mM Pepstatin  
1 mM Natrium p-Hydroxymercurbenzoat  
0,01 mM Rattenrenin-Inhibitor WFML-1

#### 5.4.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt. Diese beruht auf einer Komplexbildung zwischen den basischen Aminosäure-Seitenketten der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau des Bradfordreagenz. Die Proteinkonzentration in den Proben wurde mithilfe einer BSA-Standardreihe (4 µg/ml–40 µg/ml) bestimmt. Für die eigentliche Messung wurden die Proben verdünnt, gemischt und anschließend 50 µl mit 200 µl Bradfordreagenz versetzt. Die Adsorption wurde bei 595 nm im Tecan-Plattenreader gemessen und die Proteinkonzentration der Proben unter Berücksichtigung der Verdünnung über die Standardreihe errechnet.

#### 5.4.3.4 ANGII im Gewebe

ANGII wurde mit dem Alpco Kit bestimmt, die Anweisungen auf dem Beipackzettel wurden strikt eingehalten: Die eingetrockneten Eluate wurden in 500 µl Probenpuffer aufgenommen, es wurden 100 µl anti- ANGII zugesetzt, gemischt und 16 Stunden bei 4°C inkubiert, gefolgt

von der Zugabe von 100 µl radioaktiv ( $^{125}\text{I}$ ) markiertem ANGII, erneutem Mischen und 6 Stunden Inkubation. 100 µl des gut gemischten präzipitierenden zweiten Antikörpers wurden zugesetzt, gefolgt von erneutem Mischen und 30 Minuten Inkubation. 1 ml destilliertes Wasser wurde zugesetzt und die Proben wurden bei 1.000 g und 4°C 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet, welches markierte und unmarkierte Antigen-Antikörper Komplexe enthielt, mit dem Gammazähler untersucht und der korrigierte Gehalt an ANGII in der Probe berechnet auf die im Bradford Assay ermittelte Proteinmenge.

Der ANGII RIA erkennt ANGII, ANG3-8 und ANG4-8, aber nur zu 0,01% ANGI und ANG1-7. Das Detektionsminimum liegt bei 0,5 fmol/Ansatz.

#### 5.4.3.5 ANGI im Gewebe

Die aufgereinigten Proben wurden hinsichtlich ihrer ANGI Konzentration mit einem Peninsula Kit untersucht. Die eingetrockneten Eluate wurden in 100 µl RIA Puffer aufgenommen, es wurden 100 µl 5% BSA, 100 µl radioaktiv ( $^{125}\text{I}$ ) markiertes ANGI und 100 µl Antiserumlösung zugegeben, gemischt und für 18 Stunden bei 4°C inkubiert. 500 µl des präzipitierenden zweiten Antikörpers wurden zugesetzt und erneut für 25 Minuten inkubiert, 20 Minuten bei 1.700 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit dem Gammazähler untersucht. Die ANGI Konzentration wurde korrigiert für die Wiederfindungsrate und auf die mittels Bradford Assay ermittelte Proteinmenge bezogen.

Der ANGI RIA erkennt ANG2-10 und ANG3-10 aber nur zu 0,01% ANGII und ANG1-7. Der minimale Detektionslevel liegt bei 5 fmol/Ansatz.

RIA Puffer:    0,1% BSA  
                 7,7 mM Natriumazid  
                 0,1 M Tris  
                 85 mM Natriumchlorid  
                 0,12 M EDTA  
                 pH 7,4

#### 5.4.3.6 ANG1-7 im Gewebe

Das über die Sep-Pak Säulen gewonnene Eluat wurde eingetrocknet, in 200 µl RIA Puffer aufgenommen und zu 500 µl radioaktiv ( $^{125}\text{I}$ ) markiertem ANG1-7 gegeben. 100 µl ANG1-7 Antikörper (1:28.000 Verdünnung) wurden zugesetzt und das Gemisch bei 4°C 17 Stunden inkubiert. 300 µl der EDTA/Kaninchenserum Mischung wurden hinzugefügt, sowie 800 µl Polyethylenglycol/Anti-IgG Lösung und anschließend für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 1.300 g wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit dem Gammazähler untersucht. Die ANG1-7 Konzentration wurde für die Wiederfindungsrate korrigiert und auf die Proteinmenge bezogen.<sup>142, 143</sup>

Der ANG1-7 Antikörper reagiert mit ANG1-7, ANG2-7, aber lediglich zu 0,01% mit ANG3-7, ANGII und ANGI. Das Detektionsminimum liegt bei 4 fmol pro Ansatz.<sup>143</sup>

RIA Puffer:	0,1% BSA 7,7 mM Natriumazid 0,1 M Tris 85 mM Natriumchlorid 0,12 M EDTA, pH 7,4
EDTA/Kaninchenserum:	0,1 M EDTA 2% Kaninchenserum in RIA Puffer
Polyethylenglycol/Anti-IgG:	Anti-IgG für RIA in 20 ml RIA Puffer, vor Gebrauch 1:5 mit RIA Puffer verdünnen 6% Polyethylenglycol

## 5.5 Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Wolfgang Schneider, Experimental and Clinical Research Center Berlin Buch durchgeführt.

Die Auflösung eines Lichtmikroskops wird begrenzt durch die Wellenlänge sichtbaren Lichts. Die in der Elektronenmikroskopie verwendeten Elektronen haben eine wesentlich geringere Wellenlänge, wodurch die Auflösung größer ist. Die von einer Glühkathode stammenden, beschleunigten und mit Hilfe eines Kondensors zu einem Strahl vereinigten Elektronen durchstrahlen das sich im Vakuum befindliche Objekt. Nach Objektpassage wird der Elektronenstrahl durch Elektrolinsen geführt, wobei die Objektivlinse ein vergrößertes Zwischenbild liefert, dessen Ausschnitt auf einem Fluoreszenzschirm erscheint.

Die Fixation der Objekte erfolgte bei 4°C für 24 Stunden in Glutaraldehyd (3% in 0,1 M Kakodylatpuffer, pH 7,3), gefolgt von einer Inkubation in 0,1 M Kakodylatpuffer für 24 Stunden bei 4°C. Ebenfalls bei 4°C erfolgte die Waschung der Organe für 1 Stunde in Osmiumsäure (1% in Kakodylatpuffer) und das zweifache Spülen für jeweils 10 Minuten in destilliertem Wasser. Nach einstündiger Inkubation in Uranylacetat (1% in destilliertem Wasser) bei RT wurden die Organe über eine aufsteigende Acetonreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 100% für jeweils 30 Minuten) entwässert und für 30 Minuten bei RT in Propylenoxid, ein Zwischenmedium für die Kunstharzeinbettung, inkubiert. In Propylenoxid–Glycidether 100 (1:1) wurden die Organe über Nacht bei RT gelagert, gefolgt von der dreistündigen Einbettung bei RT in ein Eponkunstharzgemisch. In Plastikpolymerisierungsformen erfolgte die Polymerisierung über 2 Tage bei 60°C. Mit dem Ultramicrotom wurden 10<sup>-6</sup> cm dicke Schnitte angefertigt, die anschließend auf kleinen Kupfernetzen platziert wurden, auf welchen sie der Transmissionselektronenmikroskopie zugeführt wurden. Die im Ergebnisteil präsentierten Aufnahmen sind 2.000x vergrößert.

## 5.6 Statistik

Alle Tierversuche erfolgten mit einer Anzahl von mindestens  $n=5$ . Die immunhistochemische Auswertung der uteroplazentaren Einheiten der ANGII ++ Gruppe konnte nur mit  $n=2$  erfolgen, daher wurde auf statistische Berechnungen verzichtet. Für die Zellkulturversuche betrug die Anzahl ebenfalls  $n=5$ ; außer die Untersuchung der *explant*-Kulturen, die mit  $n=3$  durchgeführt wurde. Quantitative *real time*-PCR und RIA erfolgten mit einer Anzahl von mindestens  $n=5$ . Immunhistochemische Experimente wurden mit  $n=3$  Versuchen repliziert.

Um den Einfluss der Schwangerschaft auf ausgewählte Parameter zu verdeutlichen, wurden die Ausgangswerte von vor der Schwangerschaft oder dem Beginn der Schwangerschaft auf 1 gesetzt und die zu späteren Zeitpunkten der Schwangerschaft erhobenen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt und als  $x$  facher Wert aufgetragen.

Einzelwerte wurden unter Verwendung des Programms GraphPad Prism Plus ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Mittelwert:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Varianz:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Standardfehler des Mittelwertes:

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Im Allgemeinen wurden die Gruppen mit dem Kruskal-Wallis Test hinsichtlich ihrer Signifikanz verglichen. Mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney Test wurde nachgewiesen, welche beiden Gruppen sich gegeneinander signifikant verhielten.

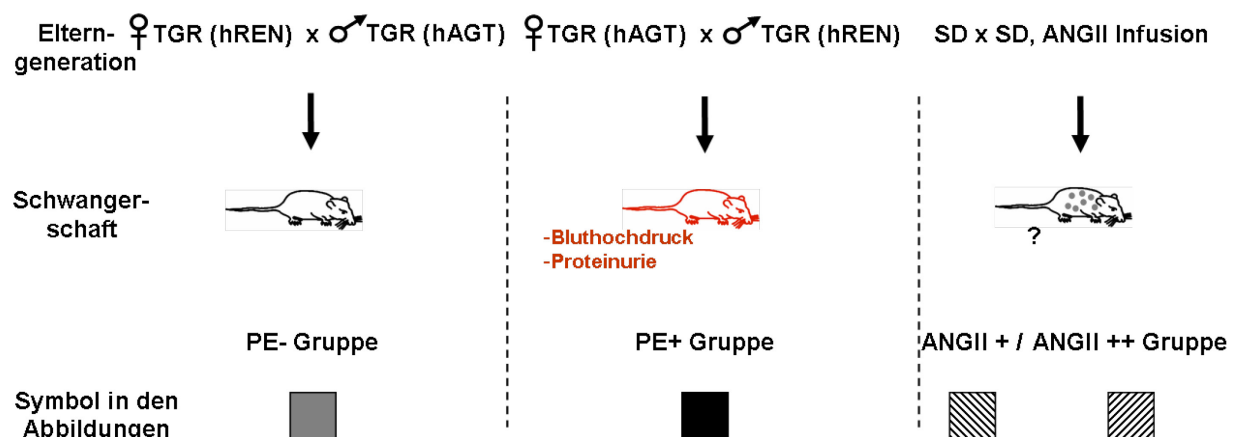
Die Invasions- und Mobilitätsexperimente mussten für die Zellpassage korrigiert werden und wurden mithilfe des Programms SPSS ausgewertet: Die Normalverteilung der Werte wurde mit dem nicht-parametrischen Kolmogorov-Smirnov Test untersucht und ergab in allen Fällen eine Gauß-Verteilung. Daher wurde im Folgenden ein *one way* ANOVA mit Bonferroni Post-Hoc Test angewendet.

Die Blutdruckkurve der Versuchstiere wurde hinsichtlich signifikanter Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen mit dem *one way* ANOVA mit Dunnett T3 Post-Hoc Test untersucht. Unterschiede innerhalb einer Gruppe im Verlauf der Schwangerschaft wurden mit dem *repeated measurement* ANOVA nachgewiesen.

Ein Ergebnis wurde als statistisch knapp signifikant betrachtet, wenn der  $p$ -Wert ( $p$ )  $< 0,05$  betrug; signifikant, wenn  $p < 0,01$  und hoch signifikant, wenn  $p < 0,001$ .

## 6 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Präeklampsie wurden Weibchen, transgen für humanes Angiotensinogen, mit für humanes Renin transgenen Männchen verpaart. Während der Schwangerschaft entwickelten diese Weibchen Bluthochdruck und Proteinurie. Dementsprechend wurde die Kreuzung als PE+ Gruppe bezeichnet. Als PE- Gruppe wurden Weibchen bezeichnet, die hREN überexprimieren und mit Männchen, die hAGT überexprimieren, verpaart wurden. Sie waren während der Schwangerschaft hinsichtlich ihres Blutdruck- und Albuminurieverhaltens unauffällig.<sup>97</sup> Wurde SD Weibchen, die von einem SD Männchen schwanger waren, Angiotensin II per osmotischer Minipumpe infundiert, wurden diese Tiere in Abhängigkeit der Angiotensin II Dosis ANGII + beziehungsweise ANGII ++ Gruppe genannt. In den Abbildungen des Ergebnisteils wurde die PE- Gruppe durch graue Balken, die PE+ Gruppe durch schwarze Balken und die ANGII + und ANGII ++ Gruppe durch schwarz schraffierte Balken symbolisiert (s. Abb. 13).



**Abbildung 13. Übersicht zu den verwendeten Tiermodellen**

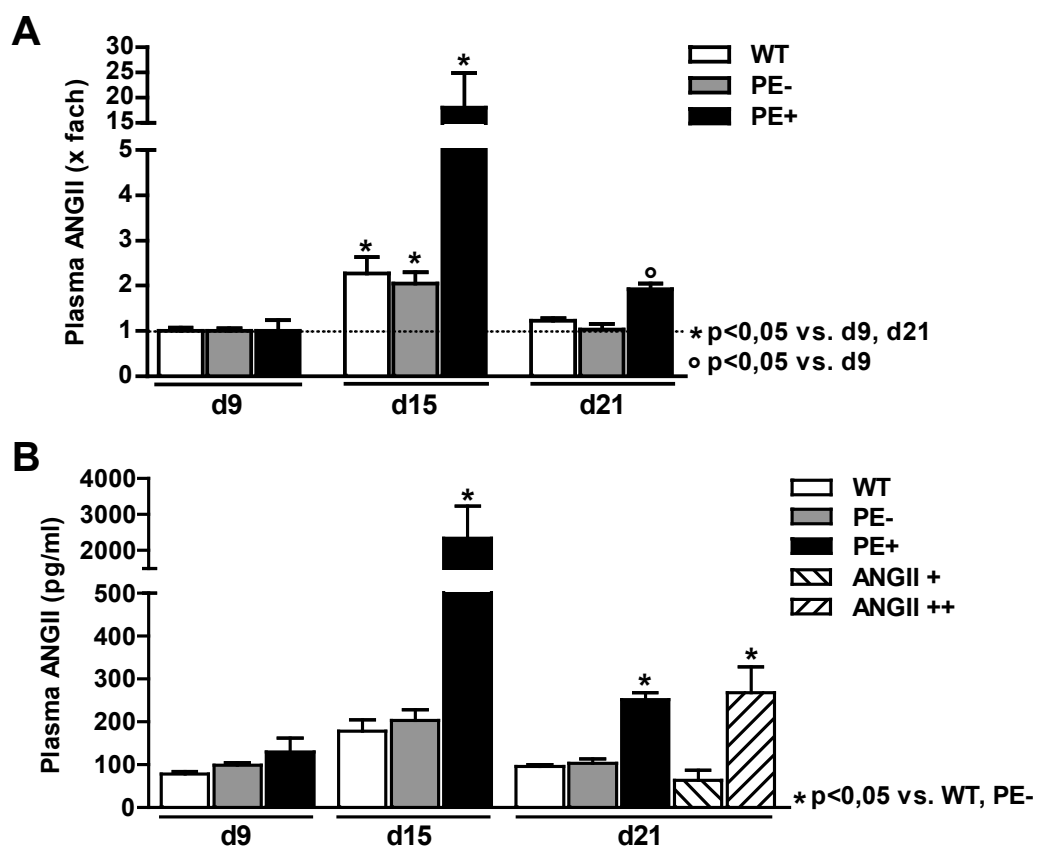
Für die PE- Gruppe wurden Weibchen, die hREN überexprimieren, mit Männchen, die hAGT überexprimieren, gekreuzt. Während dieser Schwangerschaft stiegen Blutdruck und Albuminuriewerte nicht an. Wurden Weibchen, transgen für hAGT, mit Männchen, transgen für hREN, gepaart, entwickelten diese Weibchen während der Schwangerschaft Bluthochdruck und Proteinurie; sie wurden als PE+ Gruppe bezeichnet. Für die ANGII + und die ANGII ++ Gruppe wurden Kontrolltiere miteinander verpaart und Angiotensin II per osmotischer Minipumpe verabreicht.

### 6.1 Expression des Renin-Angiotensin-Systems

In diesem Abschnitt soll das zirkulierende Renin-Angiotensin-System dem gewebespezifischen RAS in der uteroplazentären Einheit gegenübergestellt werden. Die Expression des RAS wurde auf mRNA-Ebene mittels quantitativer *real time*-PCR untersucht; auf Proteinebene wurden die Angiotensin I, Angiotensin II und Angiotensin 1-7 Expressionen im Radioimmunoassay bestimmt.

### 6.1.1 Zirkulierendes Angiotensin II

Unter dem Einfluss der Schwangerschaft stieg die Angiotensin II Plasmakonzentration an d15 in der WT, der PE- und der PE+ Gruppe an und fiel an d21 wieder signifikant ab, wobei in der PE- und der WT Gruppe das Anfangsniveau erreicht wurde, während sie in der PE+ Gruppe im Vergleich zu d9 erhöht blieb (s. Abb. 14A). Im Vergleich mit der WT und der PE- Gruppe war zirkulierendes ANGII sowohl an d15 als auch an d21 in der PE+ Gruppe erhöht. In der ANGII ++ Gruppe war die ANGII Konzentration im Vergleich zur WT und PE- Gruppe gesteigert, während in der ANGII + Gruppe keine Veränderung nachweisbar war (s. Abb. 14B).



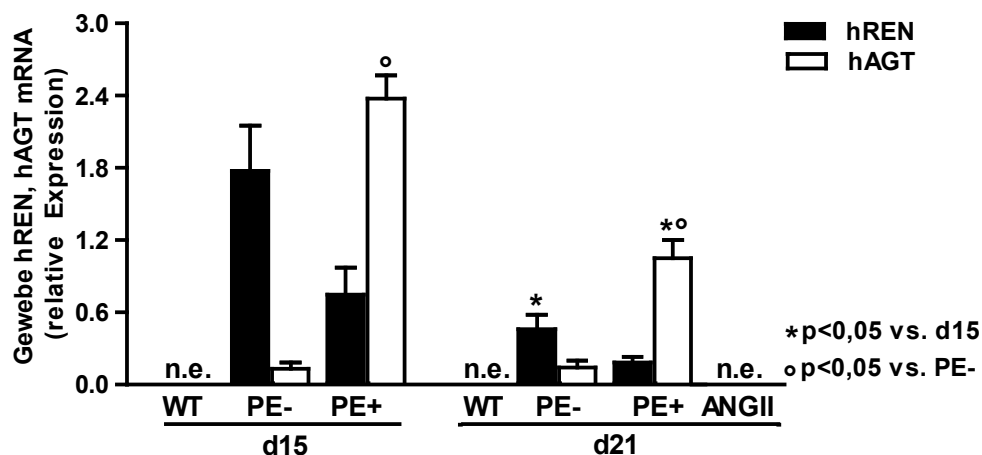
**Abbildung 14. Angiotensin II im Plasma**

Einfluss der Schwangerschaft auf zirkulierendes ANGII im Plasma auf die Werte vom Anfang der Schwangerschaft bezogen (A) sowie erneut dargestellt zum besseren Vergleich zwischen den Gruppen (B): In allen drei Gruppen stieg zirkulierendes ANGII zum 15. Tag der Schwangerschaft signifikant an, um dann zum Ende der Schwangerschaft wieder signifikant abzufallen. Ausschließlich in der PE+ Gruppe war ANGII am Ende der Schwangerschaft signifikant höher als zum Beginn der Schwangerschaft (A). Ein Vergleich mit der WT Gruppe zeigte signifikant erhöhte zirkulierende ANGII Spiegel in der Präeklampsiegruppe ab dem 15. Schwangerschaftstag. Mit der hohen Dosis ANGII infundierte Tiere zeigten mit der PE+ Gruppe vergleichbar erhöhte ANGII Spiegel, wie am Ende der Schwangerschaft nachgewiesen (B).

### 6.1.2 Uteroplazentares Renin-Angiotensin-System

Für die Entstehung einer Präeklampsie ist die Einheit aus der Plazenta und des Dezidua-Äquivalents der Ratte, dem mesometrialen Dreieck, von entscheidender Bedeutung. Daher wurde die Expression der Transgene humanes Angiotensinogen und humanes Renin in der uteroplazentaren Einheit der Versuchstiere am 15. und am 21. Tag der Schwangerschaft in Relation zur 18 S Expression bestimmt.

Wie erwartet, waren beide Transgene in der Wildtyp, der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe nicht exprimiert, während in den transgenen Gruppen sowohl hREN als auch hAGT Expression nachgewiesen werden konnte. In der PE- Gruppe war das schwangere Weibchen transgen für hREN; es wurde mit einem Männchen, das transgen für humanes Angiotensinogen war, verpaart. Unter dem Einfluss der Schwangerschaft nahm die hREN Expression in der PE- Gruppe signifikant ab während die hAGT Expression stabil blieb. In der PE+ Gruppe wurden hAGT überexprimierende Weibchen mit hREN überexprimierenden Männchen verpaart. Die hAGT Expression nahm in der PE+ Gruppe zum Ende der Schwangerschaft signifikant ab; für die hREN Expression konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Im Vergleich mit der PE- Gruppe war in der PE+ Gruppe die hAGT Expression zu beiden Zeitpunkten signifikant erhöht (s. Abb. 15).

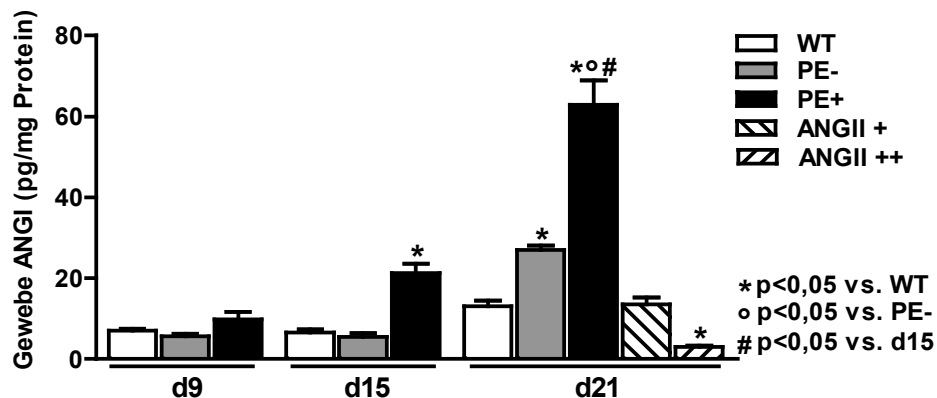


**Abbildung 15. Uteroplazentares humanes Renin und Angiotensinogen**

Während in der PE- Gruppe die hREN Expression zum Ende der Schwangerschaft signifikant abnahm, war in der PE+ Gruppe die hAGT Expression am 21. Schwangerschaftstag vermindert. Zu beiden untersuchten Zeitpunkten war die hAGT Expression in der PE+ Gruppe signifikant höher als in der PE- Gruppe. (n.e. = nicht exprimiert)



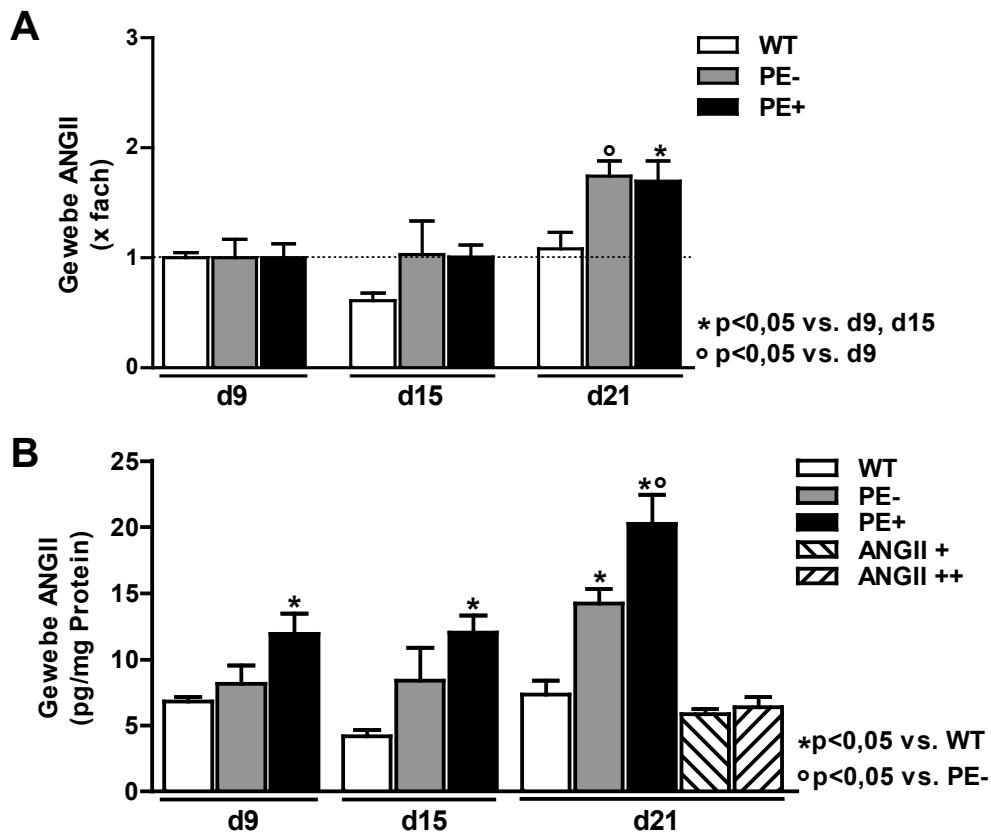
Das Enzym Renin wandelt Angiotensinogen in inaktives Angiotensin I um, welches weiter zu Angiotensin 1-7 oder Angiotensin II gespalten werden kann. In der PE+ Gruppe war uteroplazentares ANGI am 15. und stärker am 21. Schwangerschaftstag erhöht, während in der PE- Gruppe ein Anstieg an d21 zu verzeichnen war, der signifikant geringer ausfiel als in der PE+ Gruppe. ANGI war in der ANGII ++ Gruppe signifikant reduziert (s. Abb. 16).



**Abbildung 16. Angiotensin I in der uteroplazentaren Einheit**

Eine signifikante Erhöhung des gewebespezifischen ANGI ließ sich in der PE+ Gruppe bereits ab d15 nachweisen und setzt sich zum Ende der Schwangerschaft fort. In der PE- Gruppe war ANGI in der uteroplazentaren Einheit am 21. Schwangerschaftstag erhöht. Tiere, die mit der hohen Dosis ANGII infundiert wurden, zeigten eine signifikant verminderte ANGI Expression.

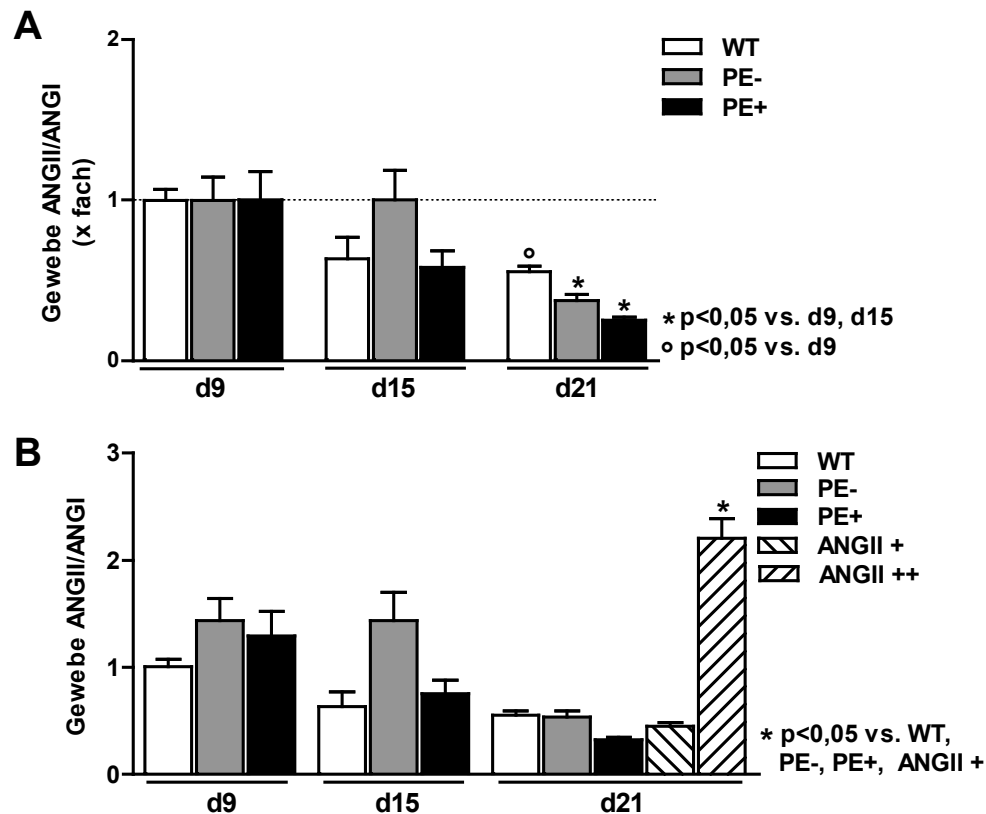
Das *angiotensin-converting-enzyme* wandelt biologisch inaktives Angiotensin I in biologisch aktives Angiotensin II um, dessen lokale Konzentration in der uteroplazentaren Einheit bestimmt wurde. Unter dem Einfluss der Schwangerschaft stieg ANGII in der PE- und der PE+ Gruppe am Ende der Schwangerschaft signifikant an, während die Schwangerschaft keinen Einfluss auf die ANGII Expression in der WT Gruppe hatte (s. Abb. 17A). Ein Vergleich der Versuchsgruppen zeigte eine signifikante Erhöhung der ANGII Konzentration in der PE+ Gruppe, die zu allen drei untersuchten Zeitpunkten nachweisbar war. Am Ende der Schwangerschaft wurde ANGII auch in der PE- Gruppe verstärkt exprimiert; die Expression war signifikant geringer als in der PE+ Gruppe. Die ANGII Konzentration wurde in der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe am 21. Schwangerschaftstag bestimmt und bewegte sich auf dem Niveau der ANGII Konzentration in der WT Gruppe (s. Abb. 17B).



**Abbildung 17. Angiotensin II in der uteroplazentaren Einheit**

ANGII Expression in der uteroplazentaren Einheit unter dem Einfluss der Schwangerschaft (A) sowie erneut aufgetragen als Vergleich zwischen den Versuchsgruppen (B): In der PE+ und der PE- Gruppe stieg ANGII in der uteroplazentaren Einheit am 21. Schwangerschaftstag signifikant an (A). Zu allen drei untersuchten Zeitpunkten war ANGII in der PE+ Gruppe im Vergleich mit der WT Gruppe signifikant erhöht. Im Vergleich mit der WT Gruppe war ANGII am 21. Schwangerschaftstag auch in der PE- Gruppe signifikant erhöht, aber signifikant geringer exprimiert als in der PE+ Gruppe. Die mit ANGII infundierten Tiere zeigten keine Veränderung in der gewebespezifischen ANGII Expression der uteroplazentaren Einheit (B).

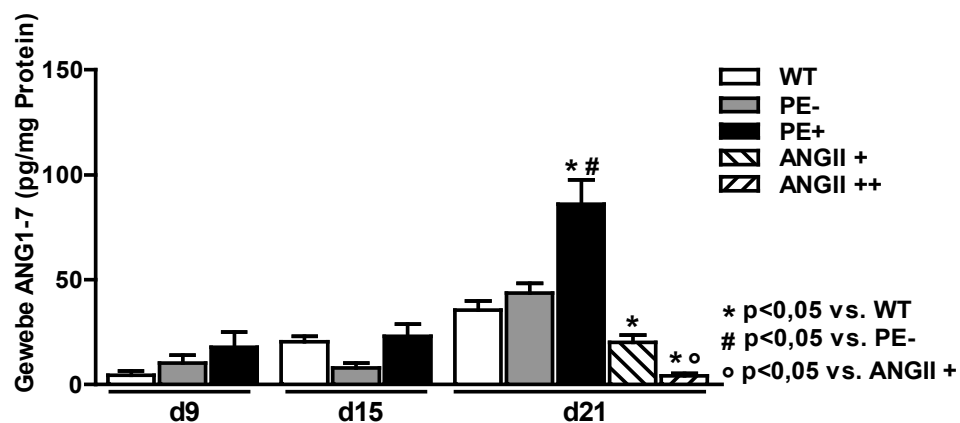
Zur Abschätzung der *ACE* Aktivität wurde das Verhältnis von biologisch aktivem ANGII zu seinem Vorläuferpeptid ANGI berechnet. Dabei weist ein hoher Wert des ANGII zu ANGI Verhältnisses auf eine hohe *ACE* Aktivität hin. Im Verlauf der Schwangerschaft sank das Verhältnis von ANGII zu ANGI in der WT, der PE- und der PE+ Gruppe signifikant ab (s. Abb. 18A). Ein Vergleich der Gruppen zeigte eine erhöhtes ANGII zu ANGI Verhältnis am 21. Schwangerschaftstag in der ANGII ++ Gruppe, während für alle anderen Versuchsgruppen keine Unterschiede feststellbar waren (s. Abb. 18B).



**Abbildung 18. ANGII/ANGI Verhältnis in der uteroplazentaren Einheit**

ANGII zu ANG I Verhältnis in der uteroplazentaren Einheit unter dem Einfluss der Schwangerschaft (A) und erneut aufgetragen als Vergleich zwischen den Versuchsgruppen (B): In der WT, der PE- und der PE+ Gruppe nahm das Verhältnis von ANGII zu ANG I zum 21. Schwangerschaftstag hin ab (A). Im Vergleich mit allen anderen Gruppen war ausschließlich in der ANGII ++ Gruppe das ANGII/ANGI Verhältnis am Ende der Schwangerschaft signifikant erhöht (B).

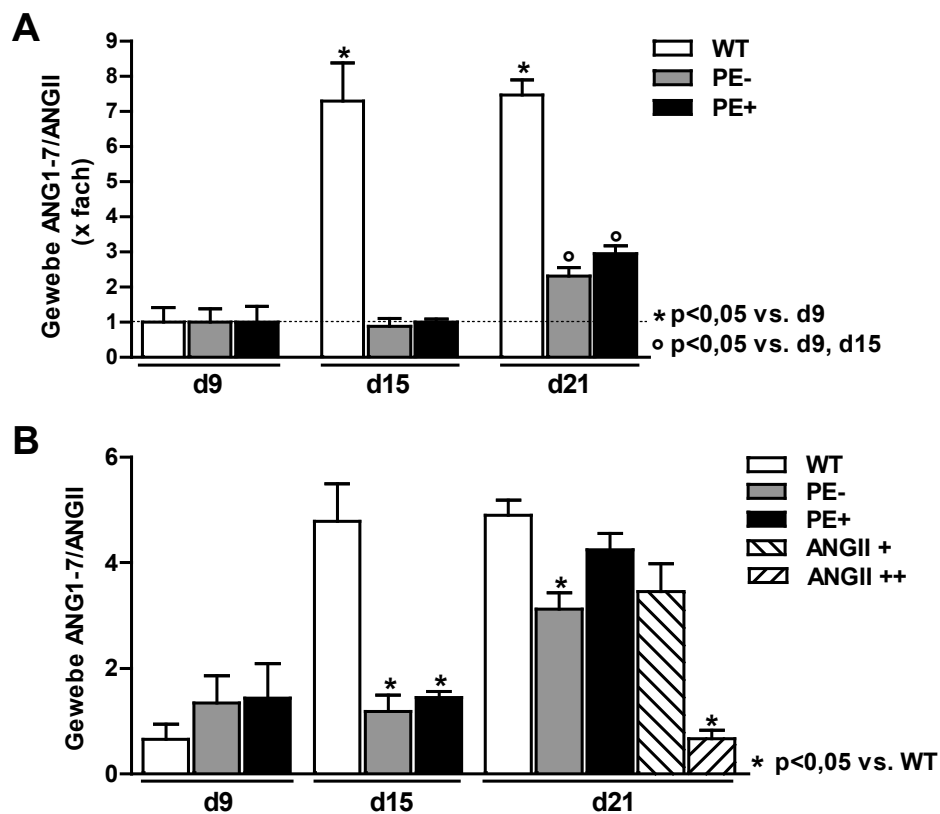
Biologisch aktives Angiotensin 1-7 entsteht entweder durch Spaltung aus inaktiven Angiotensin I oder durch Abbau von aktivem Angiotensin II. Am 21. Schwangerschaftstag war die ANG1-7 Konzentration im Gewebe der PE+ Gruppe signifikant erhöht, während in der ANGII + und stärker in der ANGII ++ Gruppe verminderte ANG1-7 Konzentrationen nachgewiesen wurden (s. Abb. 19).



**Abbildung 19. Angiotensin 1-7 in der uteroplazentaren Einheit**

Unterschiede in der uteroplazentaren ANG1-7 Expression ließen sich am 21. Tag der Schwangerschaft nachweisen. In der PE+ Gruppe wurde vermehrt ANG1-7 nachgewiesen, während in beiden mit ANGII infundierten Tiergruppen erniedrigte Expressionen gefunden wurden.

In ihrer physiologischen Wirkung verhalten sich Angiotensin 1-7 und Angiotensin II entgegengesetzt. Ein hoher Wert des ANG1-7 zu ANGII Verhältnisses weist auf ein Überwiegen der durch ANG1-7 induzierten Signalkaskade hin. Unter dem Einfluss der Schwangerschaft stieg das ANG1-7 zu ANGII Verhältnis in der WT Gruppe ab d15 signifikant an, während es in der PE- und der PE+ Gruppe erst am 21. Schwangerschaftstag erhöht war (s. Abb. 20A). Das Verhältnis von ANG1-7 zu ANGII war im Vergleich mit der WT Gruppe in der PE- und der PE+ Gruppe an d15 signifikant vermindert. Im Vergleich mit der WT Gruppe an d21 war das ANG1-7 zu ANGII Verhältnis in der PE- und in der ANGII ++ Gruppe reduziert, nicht in der PE+ Gruppe (s. Abb. 20B).



**Abbildung 20. ANG1-7/ANGII Verhältnis in der uteroplazentaren Einheit**

ANG1-7/ ANGII Verhältnis in der uteroplazentaren Einheit unter dem Einfluss der Schwangerschaft (A) und erneut aufgetragen zum besseren Vergleich der Versuchsgruppen (B): In der WT Gruppe stieg der ANG1-7/ANGII Wert im Vergleich zu d9 ab d15 signifikant an während in der PE- und der PE+ Gruppe der ANG1-7/ANGII Wert erst an d21 erhöht war (A). Ein Vergleich der unterschiedlichen Versuchsgruppen an d15 zeigte im Vergleich zur WT Gruppe signifikant erniedrigte ANG1-7/ANGII Werte in der PE- und der PE+ Gruppe. An d21 war der ANG1-7/ANGII Wert in der PE- und in der ANGII ++ Gruppe signifikant geringer als in der WT Gruppe (B).

Die Expression des Renin-Angiotensin-Systems wurde in der uteroplazentaren Einheit und im Blutplasma der Versuchstiere untersucht. Ein Vergleich der Expressionen der verschiedenen Angiotensin-Peptide miteinander machte deutlich, dass ANG1-7 das dominierende Peptid in der uteroplazentaren Einheit war. In der

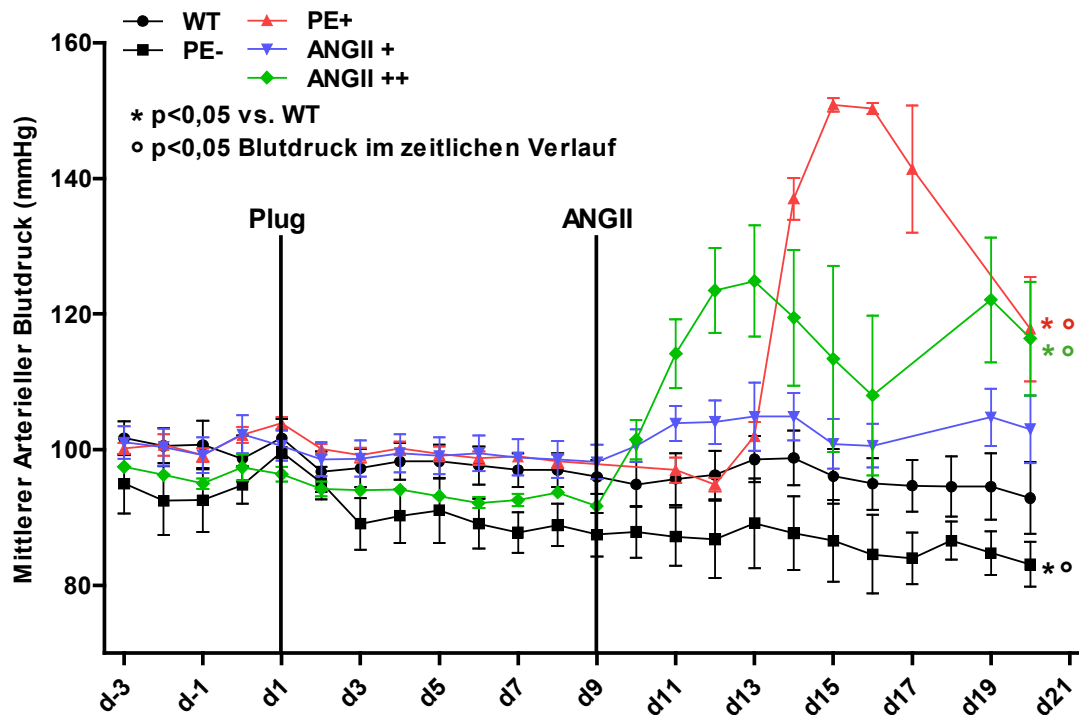
PE+ Gruppe konnten hohe gewebespezifische und hohe zirkulierende ANGII Konzentrationen nachgewiesen werden sowie erhöhte ANGI und ANG1-7 Werte in der uteroplazentaren Einheit. Das Verhältnis von ANG1-7/ANGII war im Vergleich zur WT Gruppe an d15 reduziert, stieg aber zum Ende der Schwangerschaft wieder an. Die PE- Gruppe ist ein Modell für hohe gewebespezifische ANGII Werte, während das Plasma ANGII auf Niveau der WT Gruppe lag. Im Vergleich zur WT Gruppe war das ANG1-7/ANGII Verhältnis sowohl d15 als auch d21 reduziert. Angiotensin II Infusion in hoher Dosis erhöhte zirkulierendes, nicht aber gewebespezifisches ANGII; die ANGI und ANG1-7 Konzentration ebenso wie das ANG1-7/ANGII Verhältnis im Gewebe waren vermindert (s. Tab. 6).

**Tabelle 6. ANGII in Plasma und uteroplazentarer Einheit**

	PE-	PE+	ANGII +	ANGII ++
ANGII im Plasma	↔	↑	↔	↑
ANGII im Gewebe	↑	↑	↔	↔

## 6.2 Blutdruck

Der Anstieg des Blutdrucks im letzten Drittel der humanen Schwangerschaft ist eines der beiden ausschlaggebenden klinischen Symptome für die Diagnose einer Präeklampsie. Mittels implantierter telemetrischer Sender wurde der Blutdruck kontinuierlich aufgezeichnet und als mittlerer arterieller Blutdruck dargestellt, wobei die Zeitpunkte gekennzeichnet wurden, an denen der Vaginalplug beobachtet und die ANGII gefüllten osmotischen Minipumpen in entsprechende Versuchstiere implantiert wurden. In der PE+ Gruppe stieg der Blutdruck ab d13 im Verlauf der Schwangerschaft an; über die Zeit untersucht war diese Steigung signifikant. Unbeeinflusst blieb der Blutdruck in der ANGII + Gruppe. In der ANGII ++ Gruppe kam es durch Infusion von 1.000 ng/kg/min ANGII zu einem Blutdruckanstieg ab dem 10. Tag der Schwangerschaft; statistisch ausgewertet war der Anstieg im Verlauf der Schwangerschaft signifikant. Gegensätzlich verlief der Blutdruck in der PE- Gruppe; der Blutdruckabfall erwies sich über die Zeit betrachtet signifikant. Ein Vergleich mit der WT Gruppe zeigte erhöhte Blutdruckwerte in der PE+ und der ANGII ++ Gruppe, während in der PE- Gruppe signifikant verminderter Blutdruck nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 21).



**Abbildung 21. Mittlerer arterieller Blutdruck**

In der PE+ und der ANGII ++ Gruppe stieg der Blutdruck im Verlauf der Schwangerschaft an, während in der PE- Gruppe der Blutdruck signifikant abfiel. Ein Vergleich der Gruppen zeigte eine Erhöhung des Blutdrucks in der PE+ und der ANGII ++ Gruppe und eine Reduktion in der PE-Gruppe.

Sowohl in der PE+ Gruppe als auch in der ANGII ++ Gruppe konnten hohe zirkulierende Angiotensin II Spiegel im Blutplasma sowie eine signifikante Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks nachgewiesen werden. In der PE- Gruppe war Angiotensin II uteroplazentar erhöht, nicht aber im Blutplasma. In dieser Gruppe konnte keine Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks gezeigt werden.

### 6.3 Nierenparameter

Neben dem Anstieg des Blutdrucks ist das Auftreten von Proteinen im Urin ein weiteres, entscheidendes Symptom der Präeklampsie. Mittels *ELISA* wurde der Albumingehalt im 24 Stunden Sammelurin gemessen. Erhöhte Albuminausscheidung konnte für die PE+, die ANGII + und die ANGII ++ Gruppe im letzten Drittel der Schwangerschaft nachgewiesen werden. Im Vergleich mit der PE+ und der ANGII + Gruppe war die Albuminurie in der ANGII ++ Gruppe besonders stark ausgeprägt (s. Abb. 22).

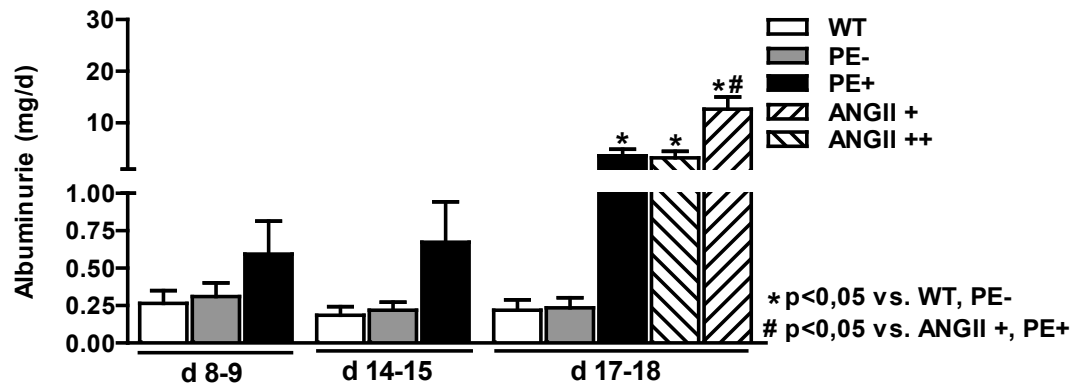


Abbildung 22. Albuminurie

Ein Vergleich der Albuminausscheidung zeigte signifikante Unterschiede am Ende der Schwangerschaft auf. In der PE+ Gruppe und beiden mit ANGII infundierten Gruppen konnte Albuminurie nachgewiesen werden. Die ANGII + Gruppe zeigte mit der PE+ Gruppe vergleichbare Albuminuriewerte, während die Albuminurie in der ANGII ++ Gruppe darüber hinausgehend signifikant erhöht war.

Das Gen für *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* wird von renalen Tubuluszellen als Reaktion auf einen akuten Schaden vermehrt exprimiert und daher als Marker für eine akute Nierenschädigung genutzt. Die *NGAL* Expression in der Niere wurde gegen die Expression des Gens 18 S mittels quantitativer *real time*-PCR getestet. In der PE+ Gruppe wurde *NGAL* überexprimiert. Im Gegensatz dazu hatte die Infusion mit ANGII eine Reduktion der *NGAL* Expression zur Folge, die umso stärker war, je höher die infundierte ANGII Dosis war (s. Abb. 23).

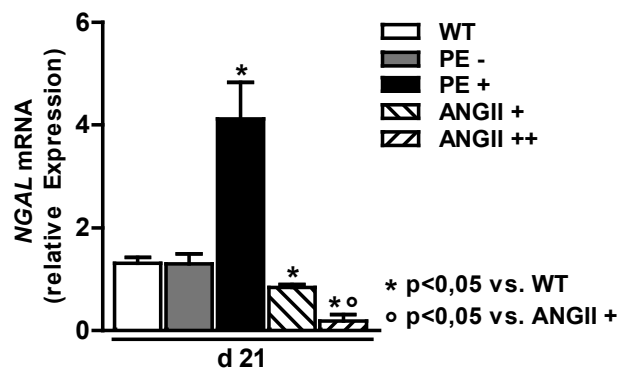
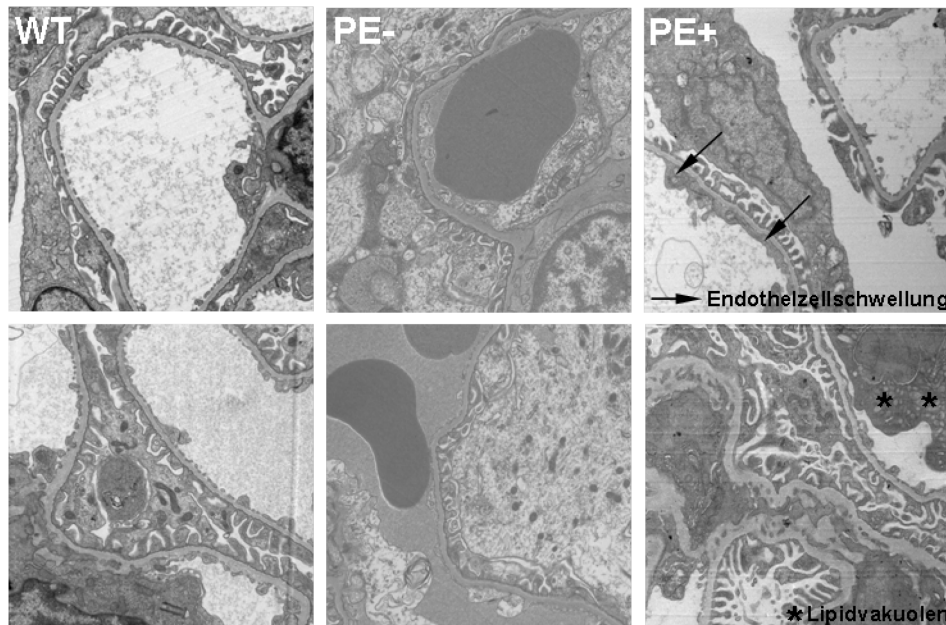


Abbildung 23. NGAL Expression in der Niere

Der Marker für akuten tubulären Nierenschaden *NGAL* wurde in der PE+ Gruppe verstärkt exprimiert, während er in den mit ANGII infundierten Tierversuchsgruppen herabreguliert war.

Der über physiologische Werte hinausgehenden Akkumulation von Albumin im Urin liegt eine Filtrationsstörung in den Nierenglomeruli oder eine verminderte Rückresorption im Nierentubulus zugrunde. Mithilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde die Niere im Bereich der Glomeruli auf angeschwollene Endothelzellen, miteinander verschmolzene Podozytenfortsätze und Lipidakkumulation hin untersucht. Als pathologisch konnten die Endothelschwellung und

das vermehrte Auftreten von Lipidvakuolen in der PE+ Gruppe eingestuft werden; in der WT und der PE- Gruppe wurden keine Abnormitäten beobachtet (s. Abb. 24).



**Abbildung 24. Elektronenmikroskopie der Niere**

Während sich der glomeruläre Bereich der Nieren in der WT und der PE- Gruppe unauffällig zeigte, konnten in der PE+ Gruppe massive Endothelzellschwellungen (Pfeilspitze) und Lipidvakuolen (Sternchen) nachgewiesen werden. (2.000x vergrößert)

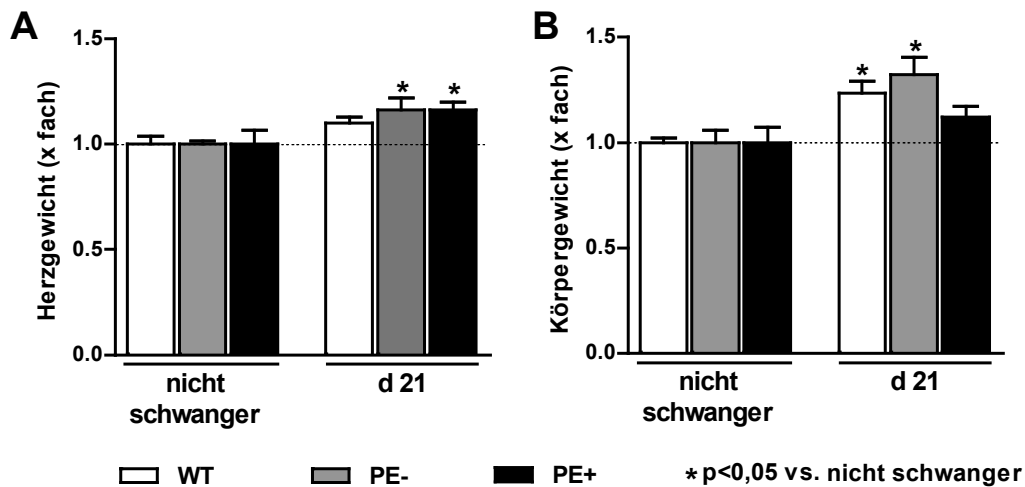
Die Nieren der Versuchstiere wurden hinsichtlich ihrer Filterfunktion, ihrer Expression eines Markers für tubuläre Nierenschädigung und ihrer Morphologie untersucht. Albuminurie als Nachweis einer beeinträchtigten Filterfunktion konnte für die PE+ Gruppe gezeigt werden. Dieses Ergebnis korreliert mit der nachgewiesenen erhöhten *NGAL* Expression und der als pathologisch eingestuften elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Nieren in der PE+ Gruppe. Albuminansammlung im Urin konnte ebenfalls für die ANGII ++ Gruppe gezeigt werden, während die *NGAL* Expression noch unter dem Expressionsniveau der WT Gruppe lag.

#### 6.4 Herzparameter

Während der Schwangerschaft kommt es im menschlichen Herz-Kreislauf-System zu massiven Umstellungen wie erhöhte Volumenbelastung oder erniedrigtem peripheren Widerstand, die zu einer physiologischen Herzhypertrophie führen. Der Einfluss der Schwangerschaft auf das Herzgewicht (s. Abb. 25A) und das Körpergewicht (s. Abb. 25B) wurde durch Wiegen der Organe beziehungsweise des Versuchstieres untersucht. In der PE- und der PE+ Gruppe wurde das Herz durch die



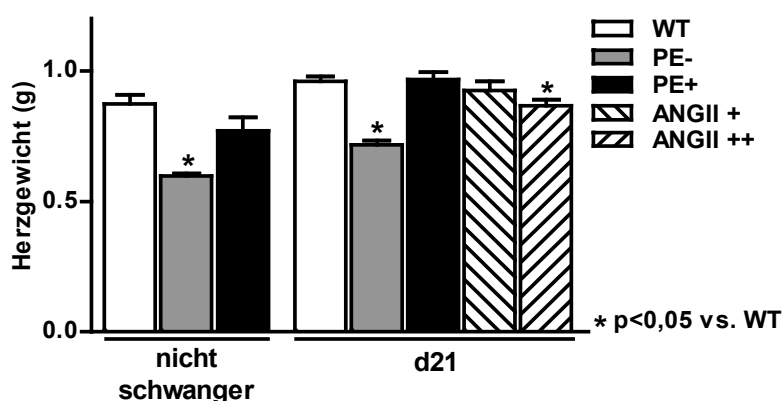
Schwangerschaft schwergewichtiger während das Körpergewicht in der WT und der PE- Gruppe signifikant zunahm.



**Abbildung 25. Herz- und Körpergewicht unter dem Schwangerschaftseinfluss**

Abbildung 25 zeigt das Herzgewicht (A) und das Körpergewicht (B) der Muttertiere: In beiden transgenen Gruppen nahm das Herzgewicht unter dem Einfluss der Schwangerschaft zu, während das Körpergewicht in der WT und der PE- Gruppe signifikant anstieg.

Um einen Vergleich zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen zu verdeutlichen, wurden die Ergebnisse aus Abbildung 25A in Abbildung 26 erneut aufgetragen. Im Vergleich mit der WT Gruppe war das Herzgewicht in der PE- Gruppe vor Eintreten der Schwangerschaft vermindert; dies konnte auch am Ende der Schwangerschaft beobachtet werden und wird daher eher nicht auf den Einfluss der Schwangerschaft zurückzuführen sein. Auch in der ANGII ++ Gruppe konnte eine Reduktion des Herzgewichtes verzeichnet werden (s. Abb. 26).

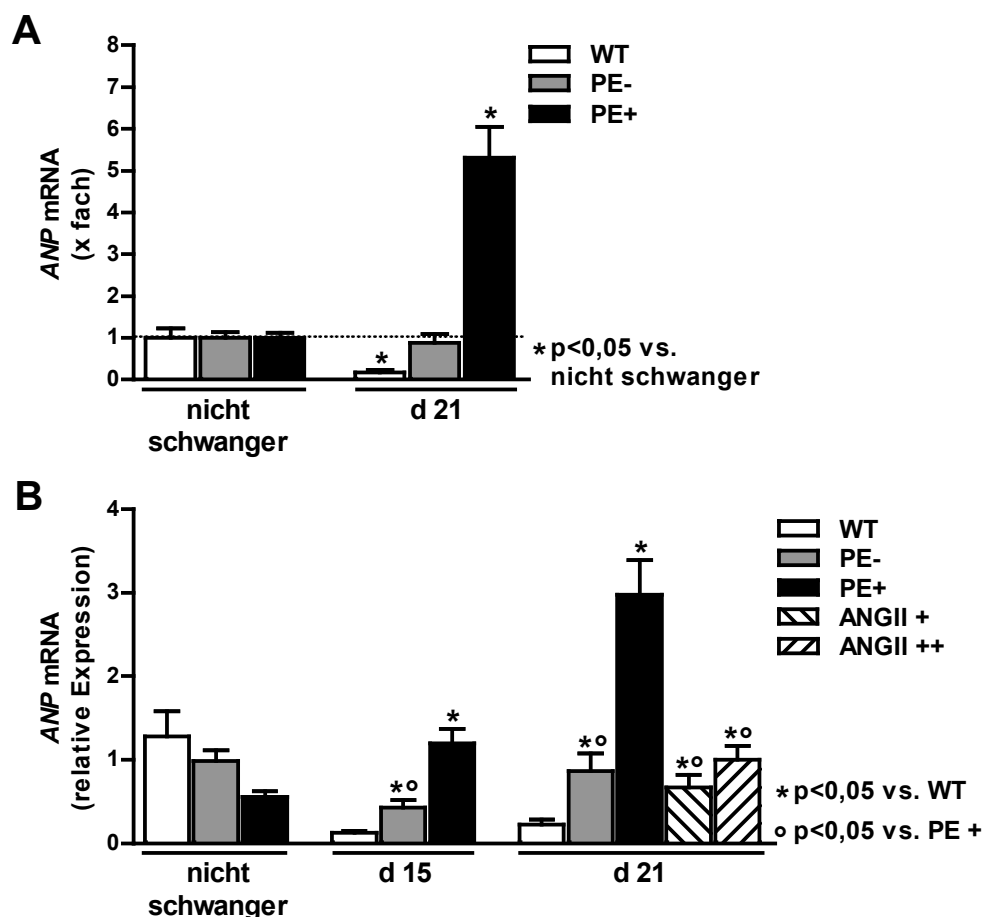


**Abbildung 26. Herzgewicht der Mutter**

Auffällig war ein im Vergleich zur WT Gruppe geringeres Herzgewichtes in der PE- Gruppe, sowohl im nicht schwangeren als auch im schwangeren Zustand. Auch in der ANGII ++ Gruppe war das Herzgewicht geringer als in der WT Gruppe.

Aufgrund von Dehnungsreizen durch erhöhten Blutdruck und erhöhte Volumenbelastung setzen Kardiomyozyten vermehrt *atrial natriuretic peptide* zur Kompensation frei. Durch quantitative *real time*-PCR wurde die Expression des

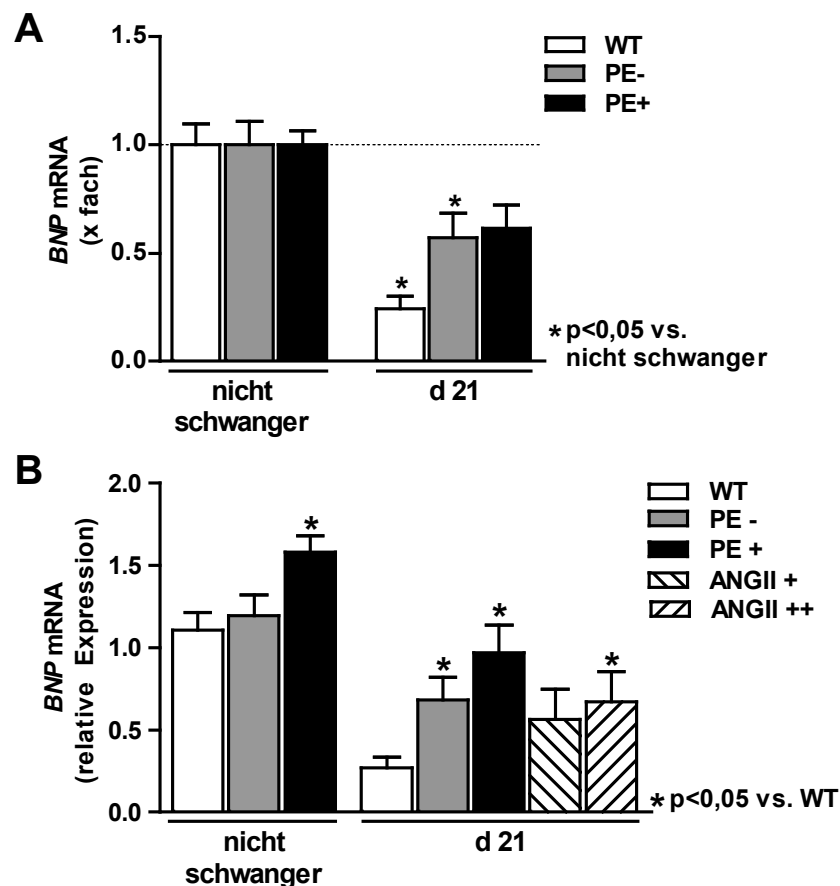
Herzhypertrophiemarkers *ANP*, bezogen auf die 18 S Expression, bestimmt. Abbildung 27A zeigt den Einfluss der Schwangerschaft auf die *ANP* Expression im Herz. In der WT Gruppe nahm die *ANP* Expression während der Schwangerschaft signifikant ab, in der PE- Gruppe hatte die Schwangerschaft keinen Einfluss und in der PE+ Gruppe wurde signifikant mehr *ANP* exprimiert. Für den Gruppenvergleich in Abbildung 27B wurden die Werte aus Abbildung 27A erneut aufgetragen und um die Ergebnisse vom 15. Schwangerschaftstag erweitert. Bereits d15 war die *ANP* Expression in der PE+ Gruppe signifikant erhöht; zum Ende der Schwangerschaft wurde *ANP* darüber hinausgehend verstärkt exprimiert. Ebenso war die *ANP* Expression in der PE- Gruppe an d15 und d21 vermehrt; verglichen mit der PE+ Gruppe fiel die Vermehrung signifikant geringfügiger aus. In der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe wurde *ANP* ebenfalls signifikant überexprimiert, allerdings signifikant geringer als in der PE+ Gruppe (s. Abb. 27).



**Abbildung 27. ANP Expression im Herz**

Die *ANP* Expression im Herz der Muttertiere fiel nach Eintritt der WT Schwangerschaft signifikant ab, wohingegen sie während der PE+ Schwangerschaft signifikant zunahm (A). Erneut aufgetragen zum Vergleich der Gruppen zeigte sich, dass die *ANP* Expression in der PE- und der PE+ Gruppe an d15 und an d21 erhöht war. Auch in beiden mit ANGII infundierten Gruppen war die *ANP* Expression am Ende der Schwangerschaft signifikant erhöht. Im Vergleich mit der PE+ Gruppe war die *ANP* Expression in der PE-, der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe d21 signifikant vermindert (B).

*ANP* wird als Akutmarker einer Herzhypertrophie beschrieben, während das *brain natriuretic peptide* eher Langzeiteffekte vermittelt. Unter dem Einfluss der Schwangerschaft nahm die *BNP* Expression, bezogen auf die 18 S Expression, im Herz der WT und der PE- Gruppe signifikant ab (s. Abb. 28A). Wie ein Vergleich zwischen den Gruppen zeigte, wurde in der PE+ Gruppe vor Eintreten der Schwangerschaft und am Ende der Schwangerschaft *BNP* überexprimiert. Lediglich am Ende der Schwangerschaft war die *BNP* Expression in der PE- und der ANGII ++ Gruppe signifikant erhöht (s. Abb. 28B).

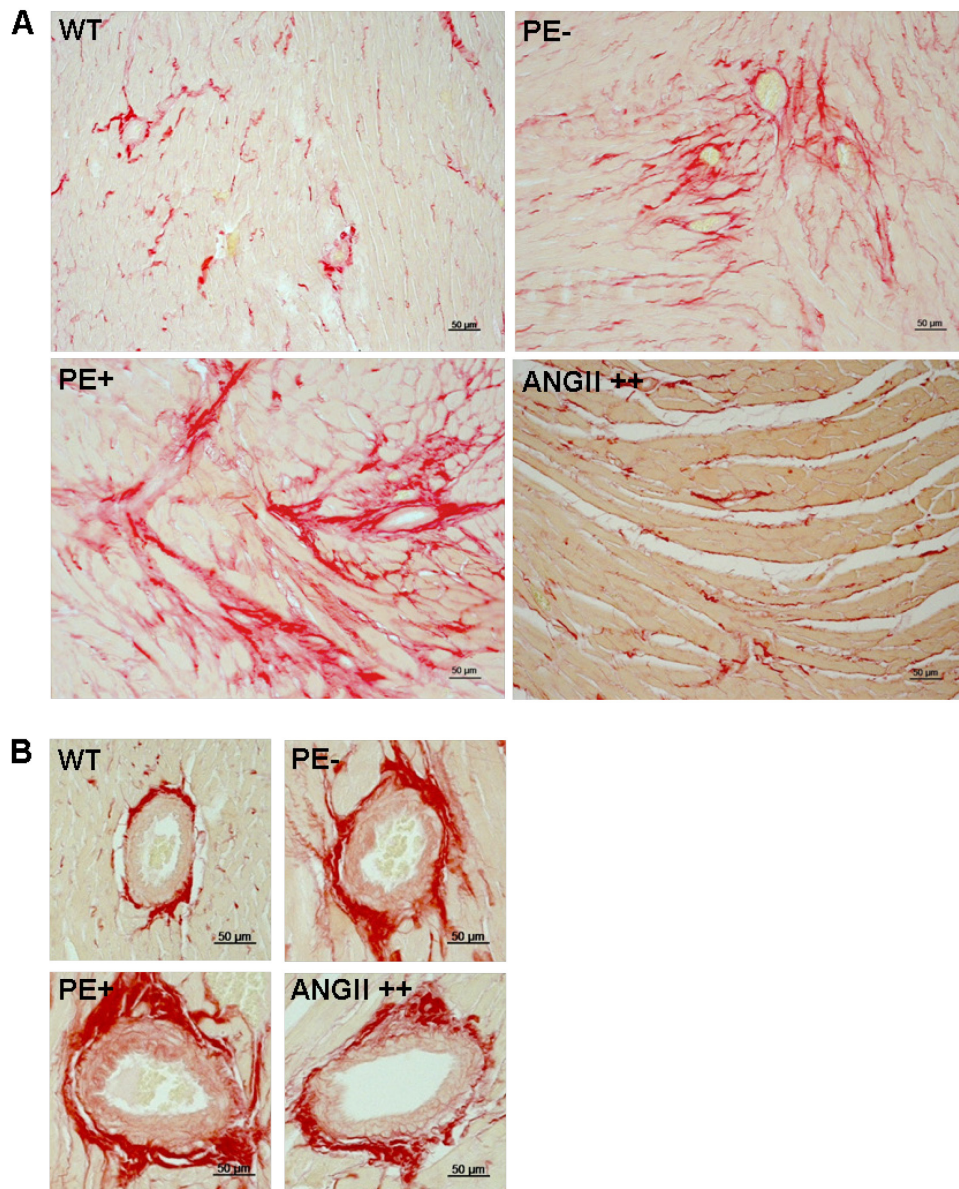


**Abbildung 28. *BNP* Expression im Herz**

Die mRNA-Expression des *brain natriuretic peptide* im Herz der Muttertiere nahm während der Schwangerschaft in der WT und der PE- Gruppe ab (A). Erneut aufgetragen zum Vergleich der Gruppen zeigte sich, dass sowohl im nicht schwangeren Zustand als auch am Ende der Schwangerschaft *BNP* in der PE+ Gruppe signifikant erhöht war, während es in der PE- und der ANGII ++ Gruppe an d21 überexprimiert wurde (B).

Weiteres Merkmal einer Herzhypertrophie ist die fortschreitende Fibrosierung des Herzens durch verstärkte Bildung extrazellulärer Matrix und Veränderung der fibrillären Fasern. Mittels *sirius red* Färbung und Hellfeldmikroskopie wurde die Fibrosierung im Herz auf Proteinebene untersucht, wobei zwischen perivaskulärer und interstitieller Fibrose unterschieden wurde. Zur Detektion perivaskulärer Fibrose wurden Arterien des linken Ventrikels ausgewählt, die nicht im Bereich des Septums

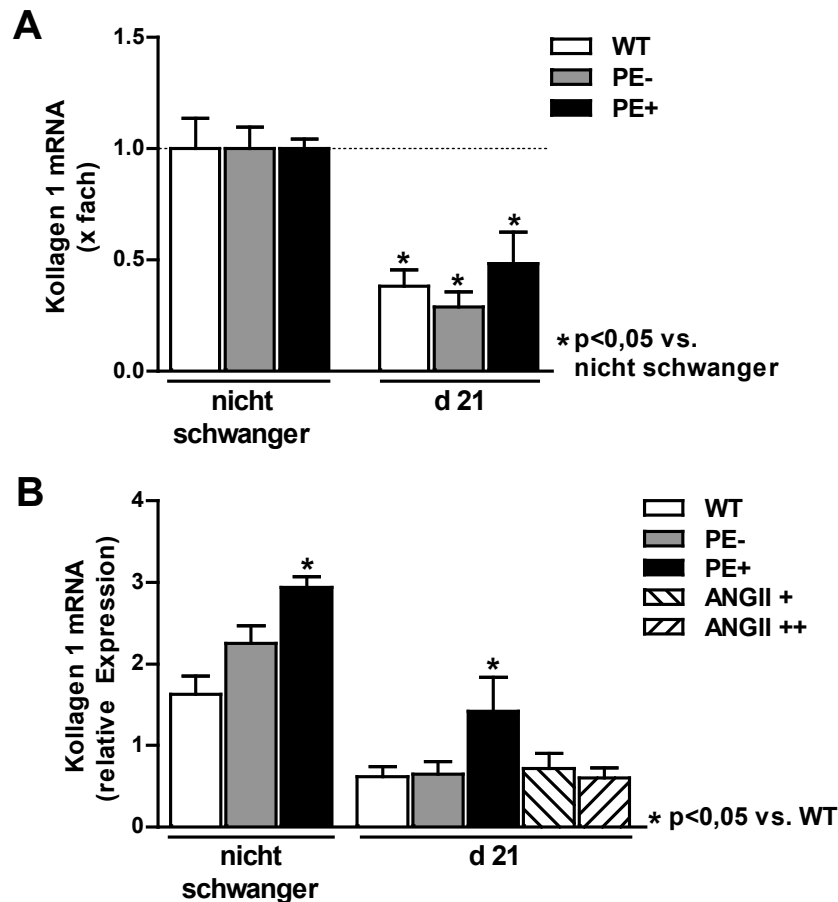
lagen. Verglichen mit den anderen Versuchstiergruppen lagerte sich in beiden untersuchten Kompartimenten der PE+ Gruppe besonders viel Farbstoff an. In der PE- Gruppe war mehr Färbung nachweisbar als in der WT Gruppe. In der ANGII ++ Gruppe waren ausgeprägte Spalten zwischen den längsverlaufenden Muskelfasern nachweisbar, die auf dilatiertes Gewebe hinweisen könnten (s. Abb. 29).



**Abbildung 29. Sirius red Färbung Herz**

Interstitielle (A) und perivaskuläre (B) Fibrose im mütterlichen Herz am 21. Schwangerschaftstag, nachgewiesen mittels *sirius red* Färbung und Hellfeldmikroskopie. Auf Proteinebene konnte bestätigt werden, dass in der PE- und besonders stark in der PE+ Gruppe vermehrt Fibrose im Gewebe als auch um die Gefäße nachweisbar war. (Maßstabsbalken entspricht 50 µm)

Die mRNA-Expression des fibrillenbildenden Kollagen 1 wurde im Herz der Muttertiere untersucht und in Beziehung zur Expression von 18 S gesetzt. Abbildung 30A spiegelt den Einfluss der Schwangerschaft auf die Kollagen 1 Expression wider. Durch die Schwangerschaft kam es in der WT, der PE- und der PE+ Gruppe zu einer signifikanten Abnahme der Kollagen 1 Expression. Ein Vergleich der Gruppen untereinander in Abbildung 30B zeigte eine Überexpression in der PE+ Gruppe auf, die vor und am Ende der Schwangerschaft nachgewiesen werden konnte.

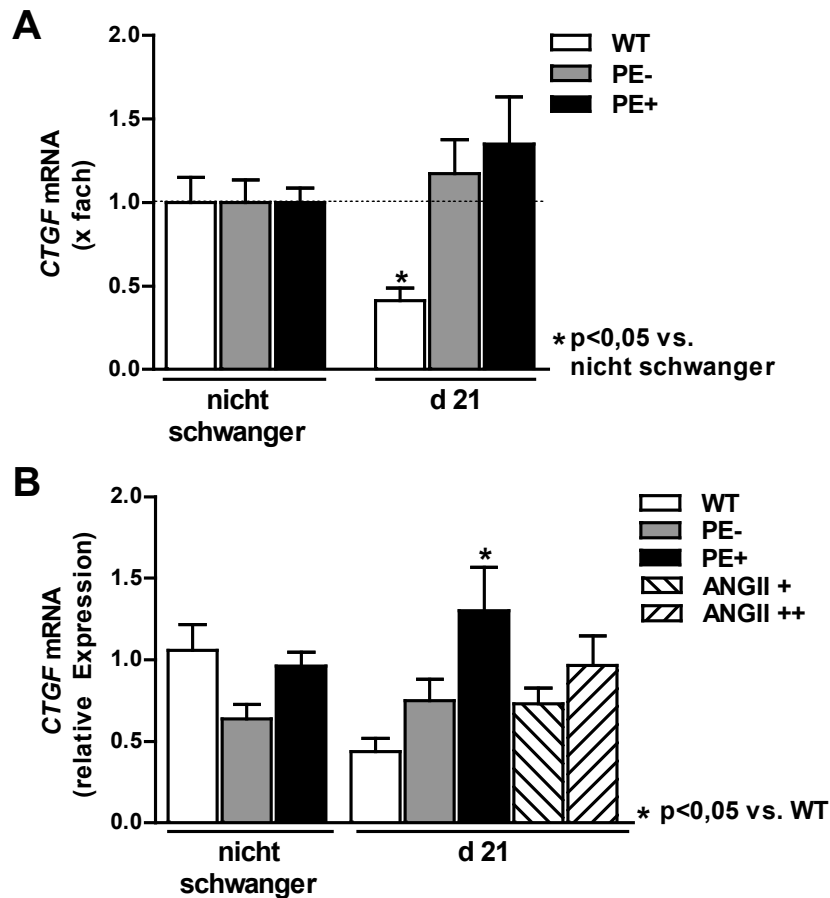


**Abbildung 30. Kollagen 1 Expression im Herz**

Expression von Kollagen 1 auf mRNA-Ebene im mütterlichen Herz vor Eintritt der Schwangerschaft und am Ende der Schwangerschaft (A) beziehungsweise aufgetragen als Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen (B): In der Schwangerschaft nahm die Kollagen 1 Expression in allen Gruppen signifikant ab (A). In der PE+ Gruppe wurde sowohl vor der Schwangerschaft, als auch am Ende der Schwangerschaft signifikant mehr Kollagen 1 exprimiert (B).

*Connective tissue growth factor* ist ein matrixassoziiertes Protein, welches die Produktion der extrazellulären Matrix stimulieren kann, in den Umbau der extrazellulären Matrix involviert ist und Matrixmetalloproteasen aktivieren kann. Normalisiert auf die 18 S Expression wurde die Expression von *CTGF* auf mRNA-Ebene im Herz der Muttertiere untersucht. Durch Schwangerschaft kam es in der WT Gruppe zu einer Runterregulierung von *CTGF* (s. Abb. 31A). Der Vergleich der

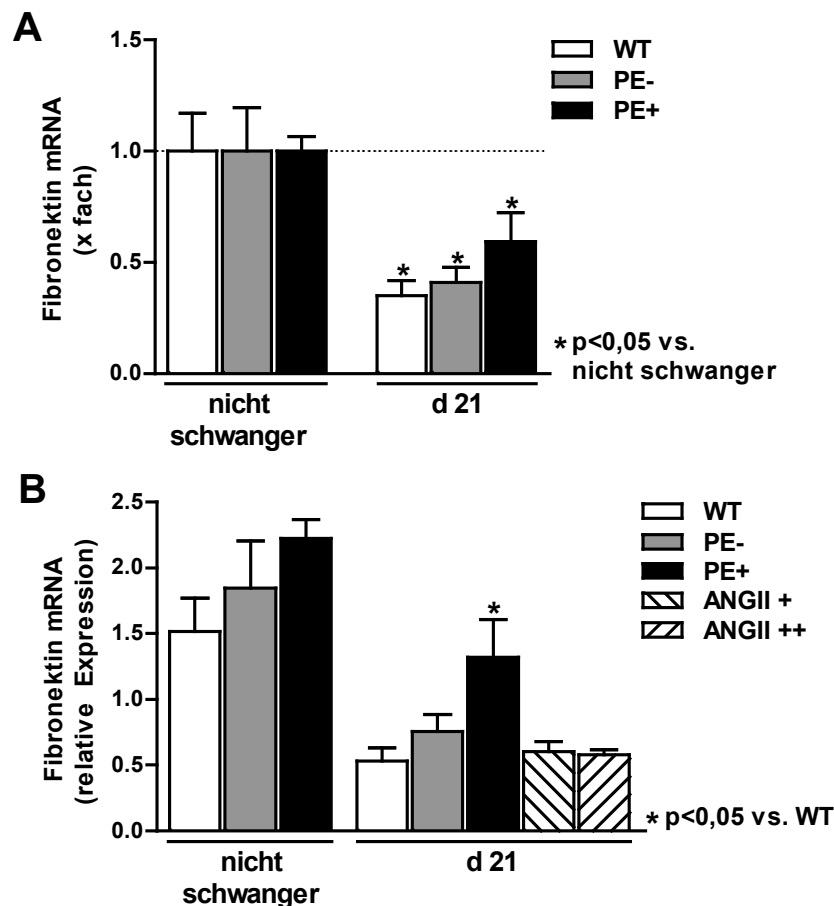
Gruppen am Ende der Schwangerschaft zeigte erhöhte Expressionswerte in der PE+ Gruppe (s. Abb. 31B).



**Abbildung 31. CTGF Expression im Herz**

*Connective tissue growth factor* Expression auf mRNA-Ebene vor und am Ende der Schwangerschaft (A), sowie ein Vergleich der unterschiedlichen Gruppen (B): In der WT Gruppe nahm die CTGF Expression während der Schwangerschaft ab (A). In der PE+ Gruppe wurde während der Schwangerschaft signifikant mehr CTGF exprimiert, verglichen mit der WT Gruppe (B).

Fibronectin ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix, welches zwischen Kollagenfasern und extrazellulärer Matrix Brücken bildet beziehungsweise als Adhäsionsmolekül bei der Zellmigration eine Rolle spielt. Normalisiert auf die 18 S Expression wurde die Fibronectin Expression im adulten Herz bestimmt. Nach Eintreten der Schwangerschaft kam es zu einer Verminderung der Fibronectin mRNA in der WT, der PE- und der PE+ Gruppe (s. Abb. 32A), während am Ende der Schwangerschaft signifikant mehr Fibronectin in der PE+ Gruppe exprimiert wurde (s. Abb. 32B).



**Abbildung 32. Fibronectin Expression im Herz**

Fibronectin Expression auf mRNA-Ebene im Herz als Vergleich zwischen dem nicht schwangeren und dem schwangeren Zustand (A), sowie als Vergleich zwischen den Gruppen (B): Während der Schwangerschaft nahm die Fibronectin Expression in allen untersuchten Gruppen signifikant ab (A). Am Ende der Schwangerschaft wurde Fibronectin im Herz der PE+ Gruppe vermehrt exprimiert (B).

Das mütterliche Herz wurde hinsichtlich einer Hypertrophie untersucht, indem das Herzgewicht bestimmt wurde, die Expression der Hypertrophiemarker *ANP* und *BNP* sowie der Fibrosemarker Kollagen 1, Fibronectin und *CTGF* ermittelt wurde.

Unter den Einfluss der Schwangerschaft stieg das Körpergewicht in der WT Gruppe an, während das Herzgewicht unverändert war. Sämtliche untersuchten Herzhypertrophie- und Fibrosemarker waren in der WT Gruppe unter der Auswirkung der Schwangerschaft runterreguliert. In der PE- Gruppe stiegen sowohl Herz- als auch Körpergewicht im Verlauf der Schwangerschaft an und die Hypertrophie- und Fibrosemarker wurden vermindert oder gleich bleibend exprimiert. Unter dem Einfluss der Schwangerschaft wurde das Herz in der PE+ Gruppe schwergewichtiger, während das Körpergewicht unverändert war. Der Herzhypertrophiemarker *ANP* stieg im Verlauf der Schwangerschaft an; die *BNP* Expression blieb unverändert. Die Expression der Fibrosemarker war nicht erhöht.

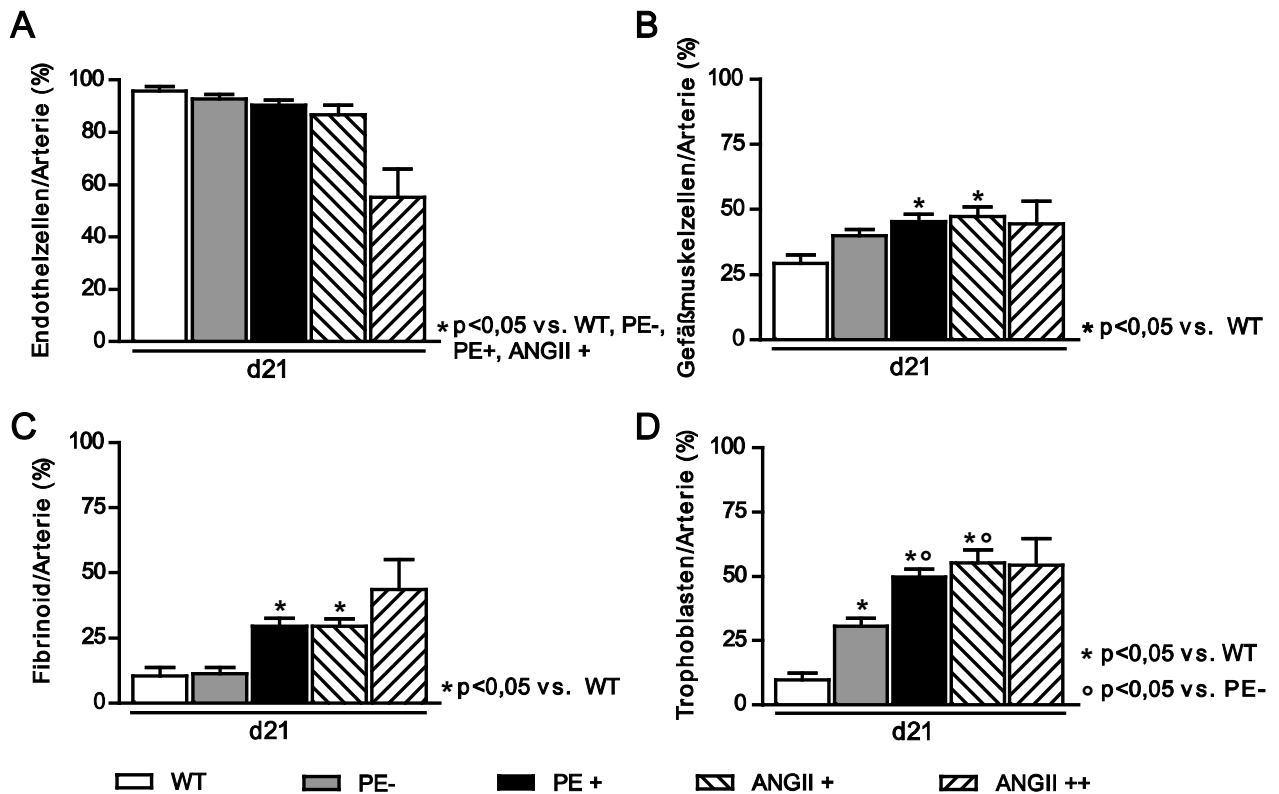
Im Vergleich mit der WT Gruppe waren die *ANP*, *BNP*, Kollagen 1, *CTGF* und Fibronektin Expressionen in der PE+ Gruppe am Ende der Schwangerschaft erhöht. In der PE- Gruppe wurden *ANP* und *BNP* stärker exprimiert als in der WT Gruppe; Kollagen 1, *CTGF* und Fibronektin wurden auf Niveau der WT Gruppe exprimiert. Im Vergleich zur WT Gruppe war das Herz der ANGII ++ Gruppe leichter und *ANP* und *BNP* waren vermehrt nachweisbar, wohingegen die untersuchten Fibrosemarker vergleichbar exprimiert wurden.

## 6.5 Spiralarterien im mesometrialen Dreieck

Durch die Spiralarterien des mesometrialen Dreiecks strömt das Blut in den mütterlichen arteriellen Kanal und weiter zum Nährstoff- und Atemgasaustausch in die Plazenta, sodass die Weite der Spiralarterien maßgeblich für die Versorgung des Fötus ist. Trophoblasten wandern aus der Plazenta entgegen dem Blutstrom in Spiralarterien ein und können diese im *remodeling*-Prozess umbauen. In einer früheren Studie wurde am 18. Schwangerschaftstag eine vom Blutdruck unabhängige Dysregulation endovaskulärer Trophoblasten im gesamten mesometrialen Dreieck nachgewiesen.<sup>33</sup> Anhand immunhistochemischer Färbungen des gesamten mesometrialen Dreiecks am 21. Schwangerschaftstag, der Endphase des *remodeling*-Prozesses, konnte die Anwesenheit von Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Fibrinoid und Trophoblasten nachgewiesen und quantifiziert werden.

Der Anteil der Endothelzellen an der Spiralarterienkontur war in allen Versuchsgruppen identisch (s. Abb. 33A). Glatte Gefäßmuskelzellen hatten einen höheren Anteil an der Spiralarterienwand in der PE+ und der ANGII + Gruppe. Auch in der PE- und der ANGII ++ Gruppe war der Anteil glatter Gefäßmuskelzellen tendenziell erhöht (s. Abb. 33B). Vermehrte Fibrinoideinlagerung in die Gefäßwand konnte in der PE+, der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe nachgewiesen werden (s. Abb. 33C). Der Anteil von Trophoblasten an der Spiralarterienwand war in der PE- Gruppe erhöht und in der PE+, der ANGII + sowie der ANGII ++ Gruppe darüber hinausgehend stärker erhöht (s. Abb. 33D). Die Resultate der ANGII ++ Gruppe wurden aufgrund der geringen Probenanzahl von n=2 nicht statistisch ausgewertet.

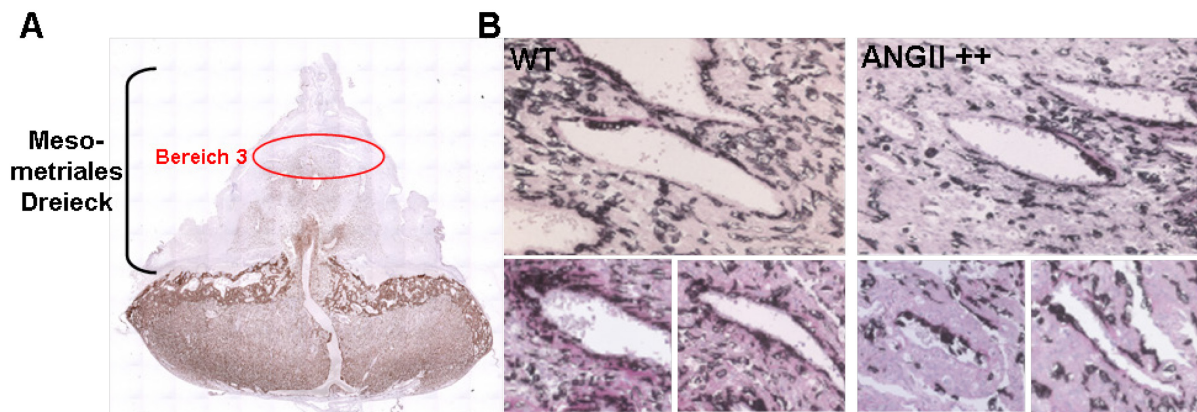




**Abbildung 33. Analyse der Spiralarterien im gesamten mesometrialen Dreieck**

Der Anteil der Endothelzellen an der Wand der Spiralarterien war einheitlich in allen Versuchsgruppen (A). Glatte Gefäßmuskulatur hatten einen höheren Anteil an der Spiralarterienwand in der PE+, der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe (B). Der Anteil von Fibrinoid, bezogen auf die Kontur der Spiralarterienwand, stieg in der PE+, der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe an (C). Endovaskuläre Trophoblasten kamen in den Spiralarterien der PE-, der PE+, der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe vermehrt vor, wobei der Anstieg in der PE+ und der ANGII + Gruppe im Vergleich zur PE- Gruppe signifikant höher war (D).

Abbildung 34A zeigt die Übersichtsaufnahme einer uteroplazentaren Einheit, in der Bereich 3 des mesometrialen Dreiecks rot hervorgehoben wurde, der zur Auswertung der tiefen Trophoblasteninvasion in plazentafernen Spiralarterien herangezogen wurde. Abbildung 34B zeigt exemplarisch die immunhistochemische Anfärbung repräsentativer Spiralarterien im plazentafernen Teil des mesometrialen Dreiecks am 21. Schwangerschaftstag, dem Endpunkt des *remodeling*-Prozesses, in der WT und der ANGII ++ Gruppe. Hohes Trophoblastenvorkommen wurde in der WT Gruppe nachgewiesen, während in der ANGII ++ Gruppe deutlich weniger Cytokeratin-positive Trophoblasten beobachtet wurden.



**Abbildung 34. Tiefe Trophoblasteninvasion in plazentafernen Spiralarterien**

Das Übersichtsbild zeigt die uteroplazentare Einheit einer Ratte mit Labyrinthplazenta und mesometrialem Dreieck, gefärbt gegen den Trophoblastenmarker Cytokeratin. Rot hervorgehoben ist der am weitesten von der Labyrinthplazenta entfernte Bereich 3 des mesometrialen Dreiecks, der zur Quantifizierung der tiefen Trophoblasteninvasion herangezogen wurde (A). Serienschnitte einer plazentafernen Spiralarterie mit Trophoblasteninvasion der WT Gruppe und der ANGII ++ Gruppe wurden gegen den Trophoblastenmarker Cytokeratin gefärbt. Verglichen mit der ANGII ++ Gruppe wurden in der WT Gruppe vermehrt Trophoblasten im Gewebe um die Spiralarterie als auch in der Spiralarterie selbst nachgewiesen (B). (20x vergrößert)

In früheren Kooperationsstudien wurde die tiefe Trophoblasteninvasion in plazentafernen Spiralarterien in der WT, der PE- und der PE+ Gruppe am 18. Schwangerschaftstag und am 21. Schwangerschaftstag untersucht: An Tag 18 war die tiefe Trophoblasteninvasion in plazentafernen Spiralarterien im Vergleich zur WT Gruppe in der PE- und der PE+ Gruppe erhöht, während dies am Ende des *remodeling*-Prozesses nur noch für die PE+ Gruppe galt.<sup>33, 144</sup>

## 6.6 Charakterisierung der Nachkommen

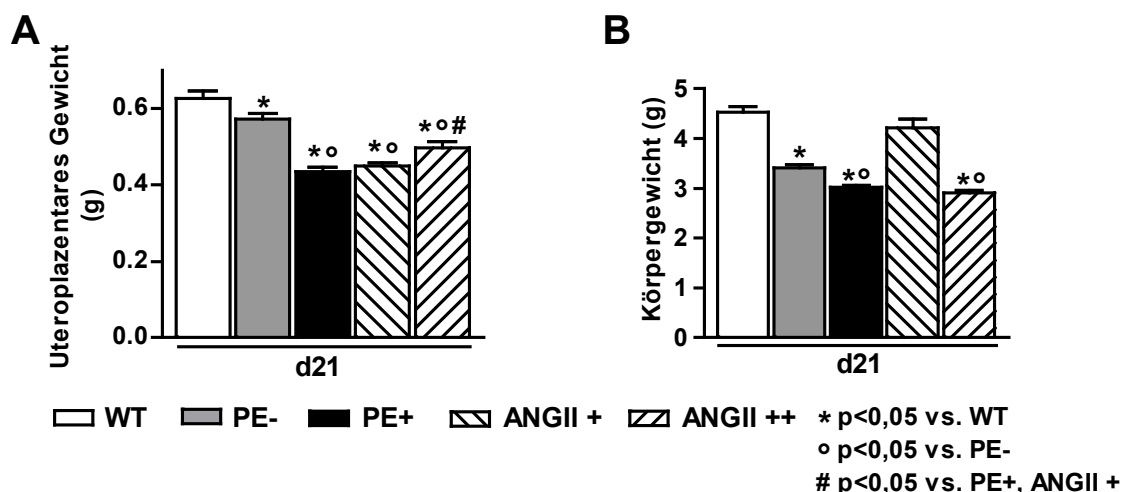
Durch das Krankheitsbild der Präeklampsie sind nicht nur die Schwangeren selbst betroffen, sondern auch der Nachwuchs. Daher soll an dieser Stelle die uteroplazentare Einheit, bestehend aus Plazenta und mesometrialem Dreieck, als das dem Fötus vorgeschaltete Organ ebenso wie der Fötus an sich untersucht werden.

Hinsichtlich der Anzahl der Föten pro Muttertier als auch der beobachteten Resorptionen konnten keine Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen festgestellt werden (s. Tab. 7).

**Tabelle 7. Anzahl der Föten und Resorptionen**

	WT	PE-	PE+	ANGII +	ANGII ++
Föten/Tier (Mittelwert)	11,12	10,5	10,6	11,5	10,2
Resorptionen/Tier (Mittelwert)	0,6	0,75	0,75	0,87	0,7

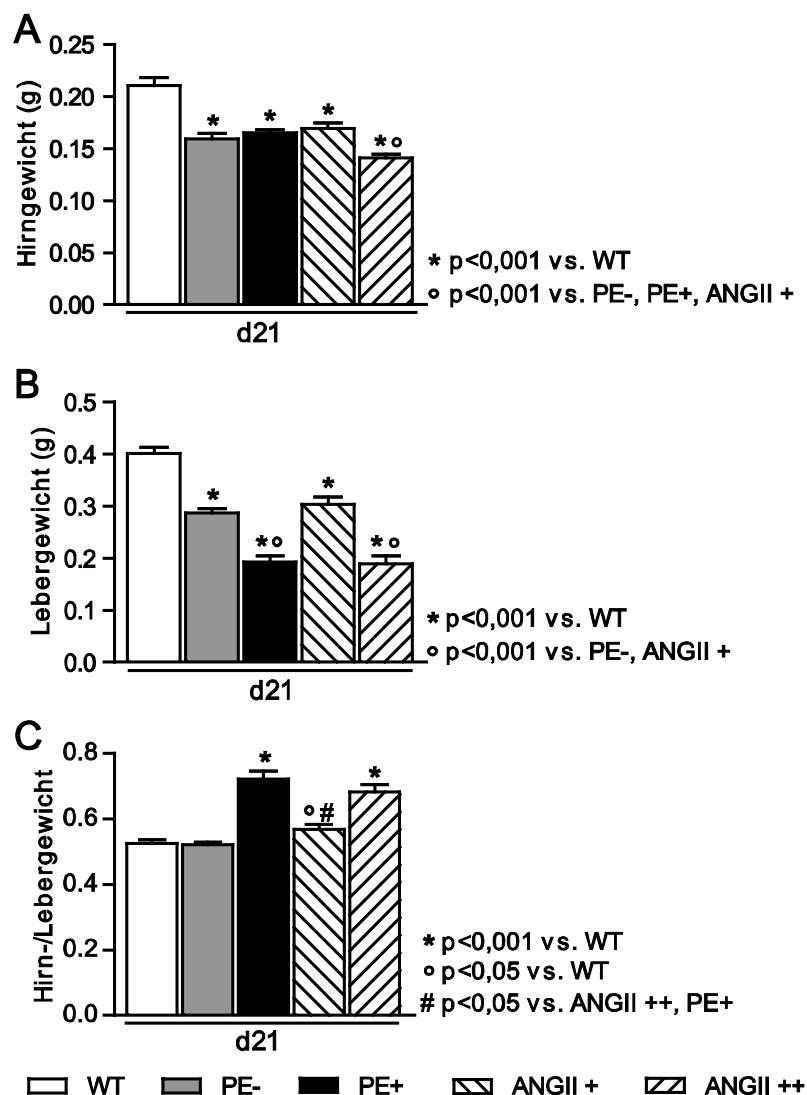
Abbildung 35A zeigt die ermittelten Gewichte der uteroplazentaren Einheit am 21. Schwangerschaftstag. Es wurde eine abgestufte Reduktion des Organgewichtes, beginnend mit einer leichten Gewichtsabnahme in der PE- Gruppe, gefolgt von der ANGII ++ Gruppe und einer starken Abnahme in der PE+ und der ANGII + Gruppe, ermittelt. Die Untersuchung des fötalen Körpergewichtes ergab eine Verminderung in der PE- Gruppe und eine darüber hinausgehende Reduktion in der PE+ und der ANGII ++ Gruppe (s. Abb. 35B).



**Abbildung 35. Gewicht der uteroplazentaren Einheit, fötales Körpergewicht**

Ermittelte Gewichte der uteroplazentaren Einheit (A) und der Föten (B): Im Vergleich mit der WT Gruppe war das uteroplazentare Gewicht in allen untersuchten Gruppen signifikant vermindert, wobei die Verminderung in der ANGII ++ Gruppe stärker und in der PE+ und der ANGII + Gruppe darüber hinausgehend verstärkt war (A). Das fötale Körpergewicht war in der PE-, der PE+ und der ANGII ++ Gruppe reduziert; die Reduktion war in der PE+ und der ANGII ++ Gruppe am stärksten ausgeprägt (B).

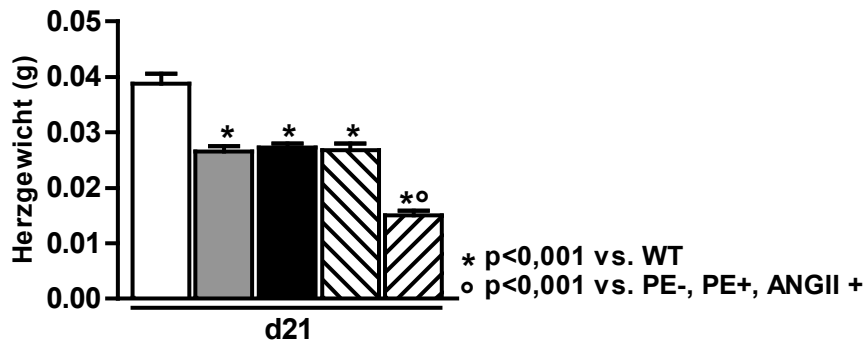
Der Fötus passt sich an limitiertes Nahrungsangebot an, indem er auf Kosten anderer Organe das Hirnwachstum aufrechterhält. So ist dann auch das Verhältnis aus Hirn- und Lebergewicht der Marker für *intrauterine growth restriction*, die durch Wiegen fötaler Organe an d21 untersucht wurde. Das Hirngewicht war im Vergleich zur WT Gruppe in allen anderen untersuchten Gruppen reduziert, besonders ausgeprägt war diese Reduktion in der ANGII ++ Gruppe (s. Abb. 36A). Im Vergleich mit der WT Gruppe war das Lebergewicht in der PE- und der ANGII + Gruppe leicht, in der PE+ und der ANGII ++ Gruppe stark vermindert (s. Abb. 36B). Das Verhältnis aus Hirn- und Lebergewicht war in der PE+ und der ANGII ++ Gruppe signifikant erhöht, da die Gewichtsabnahme in der Leber so stark ausgeprägt war (s. Abb. 36C).



**Abbildung 36. IUGR d21**

Fötales Hirngewicht (A), Lebergewicht (B) und der Quotient aus Hirn- und Lebergewicht als *IUGR* Marker (C): Der Quotient aus fötalem Hirn- und Lebergewicht stieg in der PE+, der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe signifikant an. In der PE+ und der ANGII ++ Gruppe war der Anstieg des Quotienten (C) aufgrund einer starken Leberunterentwicklung (B) besonders ausgeprägt. Das Hirngewicht nahm in der PE-, der PE+, der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe signifikant ab (A).

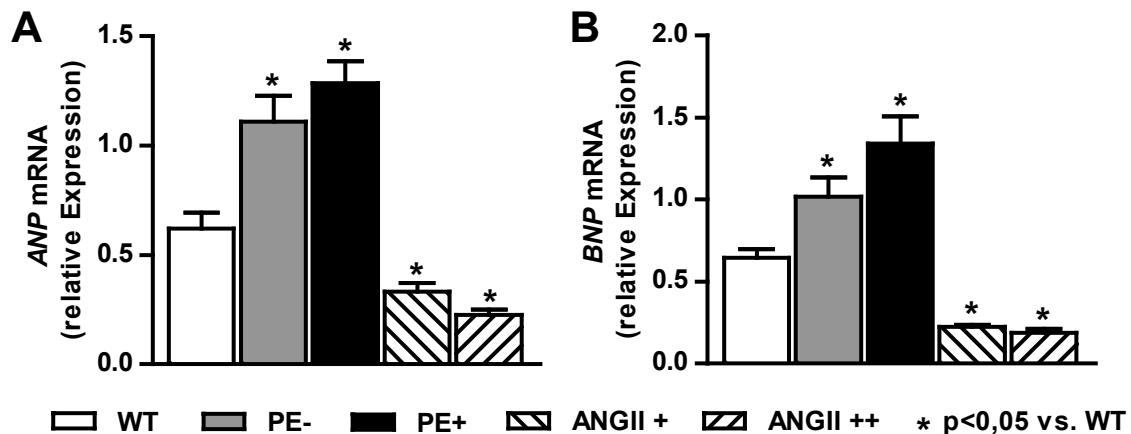
Das Herzgewicht der Föten wurde am 21. Schwangerschaftstag durch Wiegen der Organe ermittelt. Aufgrund der Schwankungen des Körpergewichts wurde auf die Darstellung des Herzhypertrophie-Index verzichtet. Im Vergleich mit der WT Gruppe war das Herzgewicht der Föten in allen Versuchsgruppen signifikant vermindert, wobei die Reduktion in der ANGII ++ Gruppe verstärkt nachweisbar war (s. Abb. 37).



**Abbildung 37. Fötales Herzgewicht**

Das Herzgewicht der Föten nahm in allen untersuchten Gruppen signifikant ab, verglichen mit der WT Gruppe. Die Reduktion trat in der ANGII ++ Gruppe besonders stark auf.

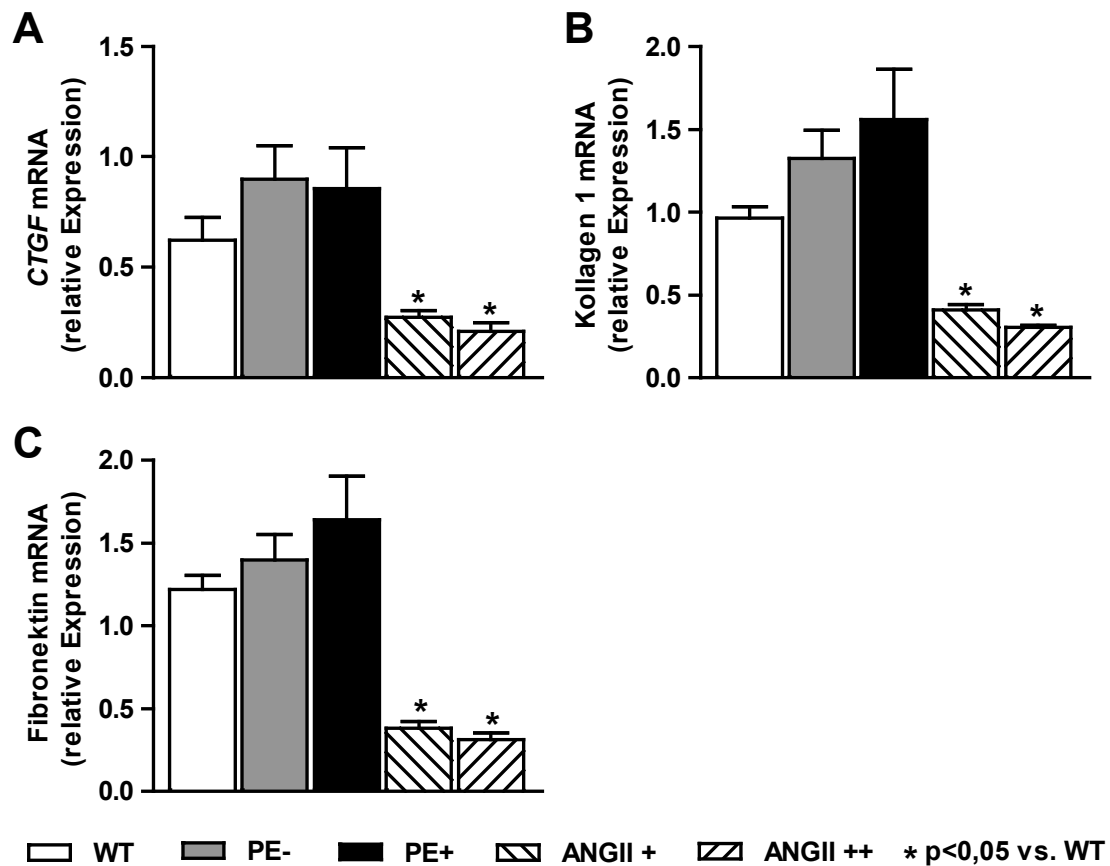
Um weitere Aussagen zur Pathophysiologie der fötalen Herzen treffen zu können, wurde die Expression der Herzhypertrophiemarker *ANP* und *BNP* mittels quantitativer *real time*-PCR bestimmt. Sowohl *ANP* (s. Abb. 38A) als auch *BNP* (s. Abb. 38B) wurden in der PE- und der PE+ Gruppe vermehrt exprimiert, während die Expressionen in der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe signifikant vermindert war.



**Abbildung 38. ANP und BNP Expression im fötalen Herz**

Die mRNA-Expression der Herzhypertrophiemarker *ANP* (A) und *BNP* (B) im fötalen Herz am 21. Schwangerschaftstag war in der PE- und der PE+ Gruppe signifikant erhöht und in der ANGII + und ANGII ++ Gruppe signifikant vermindert.

Die Expression der Fibrosemarker *CTGF* (s. Abb. 39A), Kollagen 1 (s. Abb. 39B) und Fibronectin (s. Abb. 39C) war im fötalen Herz am Ende der Schwangerschaft im Vergleich zur WT Gruppe signifikant vermindert in der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe.



**Abbildung 39. Fibrosemarker im fötalen Herz**

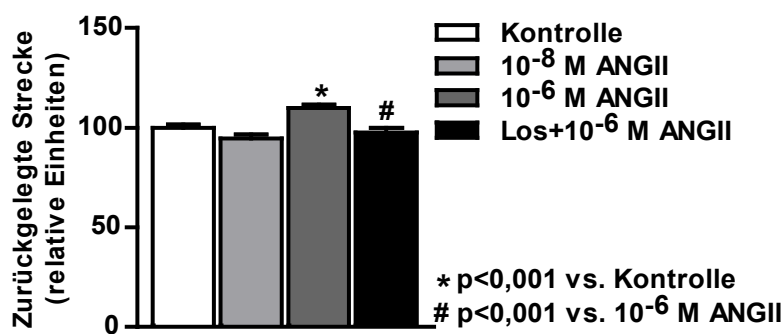
Die Expression der Fibrosemarker *connective tissue growth factor* (A), Kollagen 1 (B) und Fibronectin (C) war in der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe auf mRNA-Ebene signifikant reduziert.

Der nachgewiesenen Unterversorgung der uteroplazentaren Einheit folgte ein verringertes fötales Körpergewicht in der PE-, der PE+ und der ANGII ++ Gruppe. Das Verhältnis von fötalem Hirngewicht zu fötalem Lebergewicht war in der PE+, der ANGII+ und der ANGII ++ Gruppe erhöht. Das fötale Herzgewicht war in der PE-, der PE+ und der ANGII + Gruppe erniedrigt; besonders vermindert war es in der ANGII ++ Gruppe. Die Expression der Herzhypertrophiemarker war in der PE- und der PE+ Gruppe erhöht, während sie in der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe vermindert war. Ebenso reduziert war die Expression der untersuchten Fibrosemarker in der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe.

## 6.7 Trophoblastenversuche

Der Einfluss von Angiotensin II sollte nicht nur *in vivo* im Tiermodell untersucht werden, sondern auch *in vitro* durch Zuhilfenahme der etablierten Trophoblastenzelllinie PL4 oder primärer *explant*-Kulturen der Plazenta. Dabei wurden verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt, die den Zusammenhang zwischen dem Stimulans ANGII in zwei unterschiedlichen Konzentrationen und physiologischen Parameter wie Mobilität, Migration, Invasion, Proliferation und Apoptose aufklären sollten. Der Angiotensin II Typ 1 Rezeptorblocker Losartan wurde eingesetzt, um zu zeigen, dass die beobachteten Effekte durch ANGII vermittelt waren.

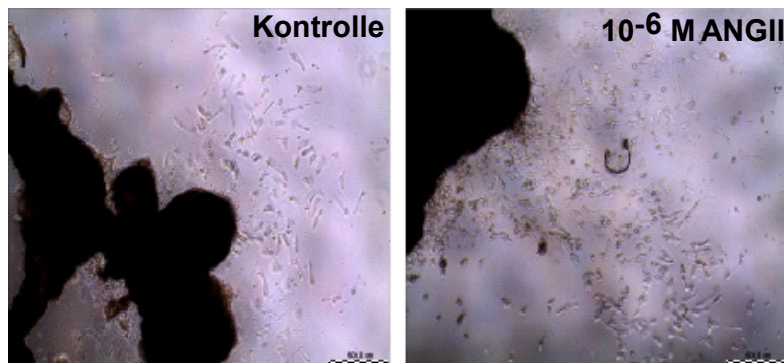
Im Mobilitätsexperiment wurde untersucht, welche Wegstrecke PL4 Trophoblasten auf der unbeschichteten Zellkulturplatte in einer definierten Zeit zurücklegten. Stimulation mit  $10^{-6}$  M ANGII hatte einen signifikanten Anstieg der PL4 Mobilität zur Folge, der durch Losartan umkehrbar war (s. Abb. 40).



**Abbildung 40. Mobilität SGHPL4**

Abbildung 40 zeigt die Beweglichkeit der Trophoblastenzelllinie auf unbeschichteten Zellkulturplatten. Die während des Beobachtungszeitraumes von 6 Stunden zurückgelegte Strecke war nach Stimulation mit  $10^{-6}$  M ANGII signifikant erhöht. Diese Zunahme war durch Gabe des AT1-R Blockers Losartan umkehrbar.

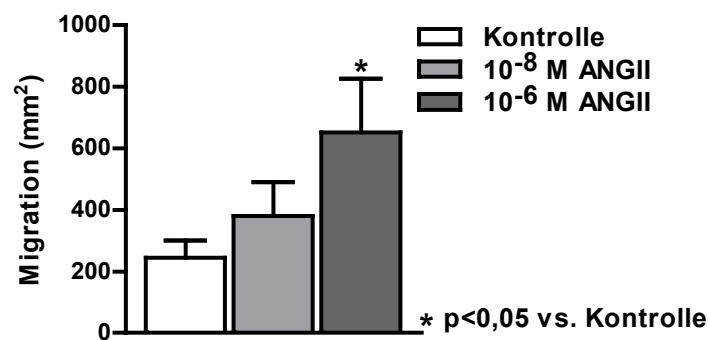
Das folgende Experiment sollte die Migration primärer Trophoblasten auf mit Kollagen beschichteten Zellkulturplatten analysieren. Dabei hefteten sich *explant*-Kulturen auf der Platte fest und extravillöse Trophoblasten wanderten aus, sodass ihre Migrationsfläche bestimmt werden konnte, die bereits rein optisch nach Stimulation mit  $10^{-6}$  M ANGII vergrößert war. Auch die Anzahl der ausgewanderten extravillösen Trophoblasten war im Vergleich zur Kontrolle erhöht (s. Abb. 41).



**Abbildung 41. Migration *explant*-Kultur**

Migration von primären Trophoblasten auf kollagenbeschichteten Zellkulturplatten ausgehend von angehefteten *explant*-Kulturen: Bereits ohne quantitative Auswertung ist ersichtlich, dass sowohl Migrationsfläche als auch Anzahl der ausgewanderten Zellen nach Stimulation mit ANGII erhöht war. (Maßstabsbalken entspricht 500 µm)

Die quantitative Auswertung der Migrationsfläche zeigte eine Vergrößerung in der mit  $10^{-6}$  M ANGII behandelten Gruppe (s. Abb. 42). Aufgrund der Limitation des Materials musste auf eine mit Losartan zu behandelnde Versuchsgruppe verzichtet werden.

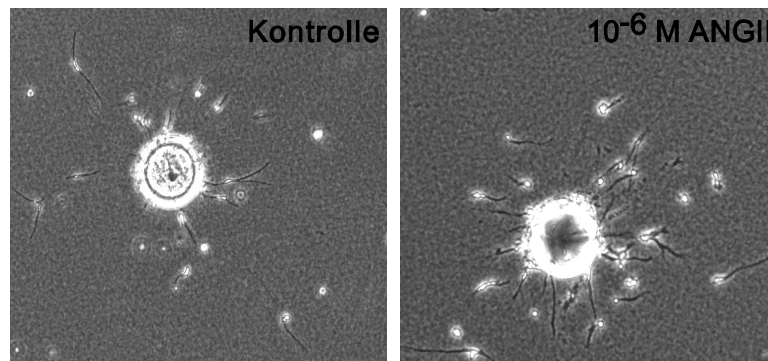


**Abbildung 42. Migrationsassay**

Eine quantitative Auswertung zeigte, dass eine Stimulation mit  $10^{-6}$  M ANGII die Migrationsfläche signifikant vergrößerte.

Im Invasionsexperiment wurde die Beweglichkeit von PL4 Trophoblasten in einer dreidimensionalen Fibrinmatrix getestet. Abbildung 43 zeigt exemplarisch die ins Fibrinigel eingebetteten, ursprünglich von Trophoblasten bedeckten Kügelchen, von denen ausgehend Trophoblasten in die Matrix auswanderten. Bereits auf den Abbildungen war eine Zunahme der Anzahl der ausgewanderten Zellen und der zurückgelegten Wegstrecke nach Stimulation mit  $10^{-6}$  M ANGII ersichtlich.

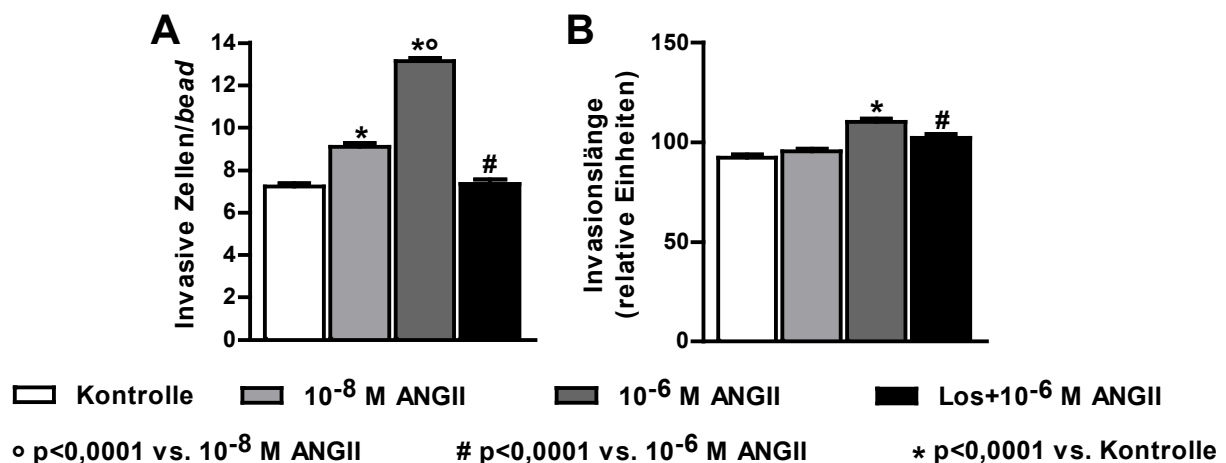




**Abbildung 43. Invasion SGHPL4**

Invasionsexperimente, in denen Trophoblasten von Kügelchen ausgehend in die umgebende Fibrinmatrix auswanderten: Stimulation mit ANGII erhöhte sowohl die Anzahl der ausgewanderten Zellen pro Kügelchen als auch die zurückgelegte Strecke. (40x vergrößert)

Die quantitative Analyse bestätigte die Zunahme der ausgewanderten Zellen/Kügelchen in beiden mit ANGII behandelten Versuchsgruppen, wobei ein dosisabhängiger Effekt zu beobachten war. Die Zunahme nach ANGII Stimulation konnte durch den Einsatz von Losartan gehemmt werden (s. Abb. 44A). Lediglich durch  $10^{-6}$  M ANGII konnte die Invasionslänge signifikant beeinflusst werden, wohingegen  $10^{-8}$  M ANGII keinen Einfluss hatte. Auch dieser Effekt war reversibel durch Gabe von Losartan (s. Abb. 44B).

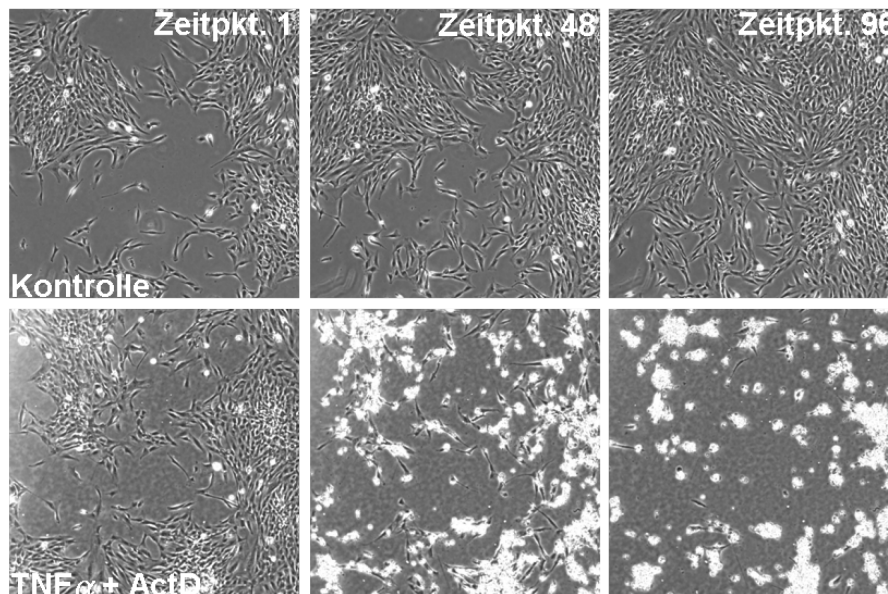


**Abbildung 44. Invasionsassay**

Resultat der quantitativen Auswertung des Invasionsassays, wobei A die Anzahl invasiver Zellen pro Kügelchen abbildet, während B die Invasionslänge in relativen Einheiten zeigt. Die Anzahl invasiver Zellen war nach Stimulation mit  $10^{-8}$  M ANGII signifikant erhöht, eine Stimulation mit  $10^{-6}$  M ANGII erhöhte die Anzahl darüber hinausgehend. Dieser Effekt war umkehrbar durch Einsatz des AT1-R Blockers Losartan (A). Der Parameter Invasionslänge war nach Zugabe von  $10^{-6}$  M ANGII signifikant erhöht. Auch dieser Effekt war durch Losartangabe umkehrbar (B).

Um den pro- beziehungsweise anti-apoptotischen Einfluss von ANGII zu untersuchen, wurde die Apoptose der PL4 Zellen durch eine Kombination aus  $\text{TNF}\alpha$  und Actinomycin D ausgelöst und zu definierten Zeitpunkten die Zellmorphologie beobachtet. In der oben abgebildeten Kontrollgruppe kam es zu einer Vermehrung

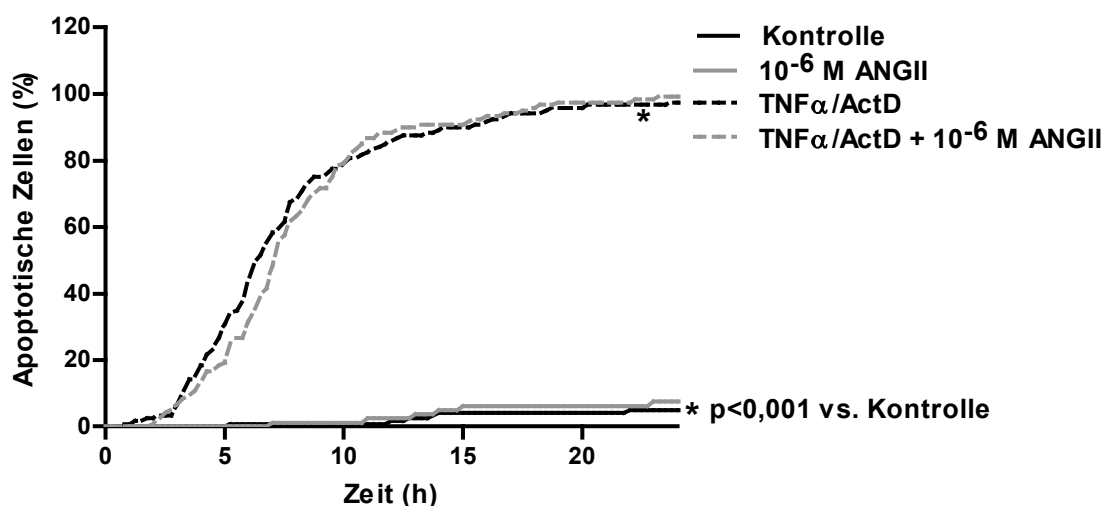
der Zellen, während in der unten abgebildeten Gruppe, der Apoptoseinduktoren zugesetzt waren, sterbende Zellen zu beobachten waren (s. Abb. 45).



**Abbildung 45. Apoptose SGHPL4**

Aufnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Apoptoseassays: In der mit Apoptoseinduktoren ( $\text{TNF}\alpha$ , ActD) behandelten Gruppe nahm die Anzahl toter Zellen, erkennbar an der veränderten Zellmorphologie, zu, während in der Kontrollgruppe eine Vermehrung der Zellen zu beobachten war. (40x vergrößert)

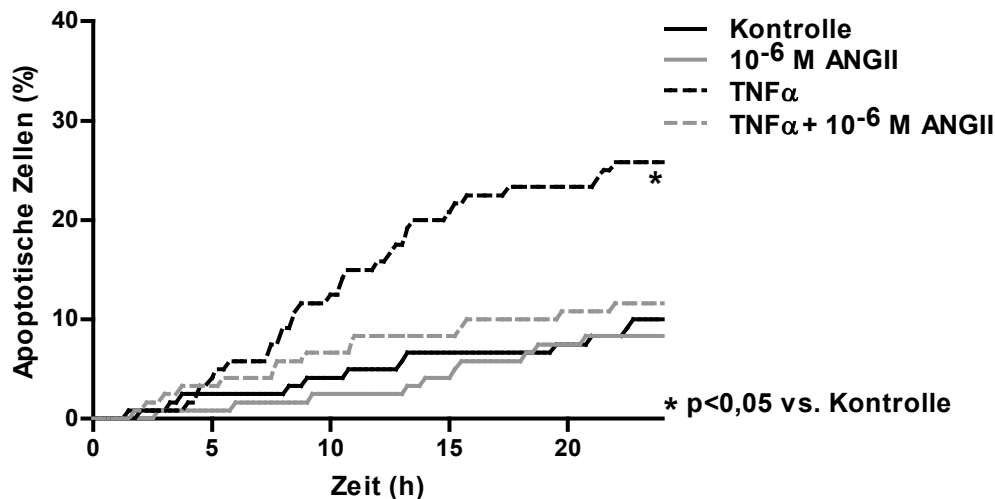
Die quantitative Auswertung des Apoptoseversuches zeigte eine signifikante Induktion der Apoptose durch  $\text{TNF}\alpha$  und Actinomycin D über die Zeit. Wurden  $10^{-6}$  M ANGII zugegeben, veränderte sich die Apoptoserate weder positiv noch negativ (s. Abb. 46).



**Abbildung 46. Apoptoseassay  $\text{TNF}\alpha$ , ActD**

In diesem Versuch wurde Apoptose durch eine Kombination aus 30 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  und 800 ng/ml Actinomycin D ausgelöst, welches eine signifikante Zunahme der Sterblichkeit der Trophoblasten über die Zeit hatte, sodass gegen Ende des Versuches keine lebenden Zellen mehr nachweisbar waren. Die Gabe von  $10^{-6}$  M ANGII hatte weder pro- noch anti-apoptotische Effekte.

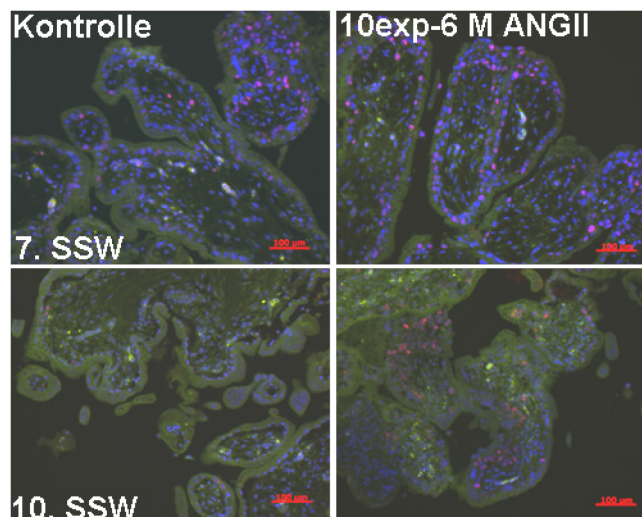
Um zu testen, ob die durch eine Kombination aus  $\text{TNF}\alpha$  und Actinomycin D induzierte Apoptose vielleicht zu stark war, als dass ANGII in den eingesetzten Konzentrationen einen Effekt hätte auslösen können, wurde die Apoptose für folgende Versuchsreihe lediglich durch  $\text{TNF}\alpha$  ausgelöst. Erneut waren weder pro- noch anti-apoptotische Effekte nachweisbar (s. Abb. 47).



**Abbildung 47. Apoptoseassay  $\text{TNF}\alpha$**

Hier wurde die Apoptose durch 30 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  induziert. Dadurch stieg die Apoptoserate über die Zeit signifikant an. Eine Gabe von  $10^{-6}$  M ANGII hatte weder pro- noch anti-apoptotische Effekte.

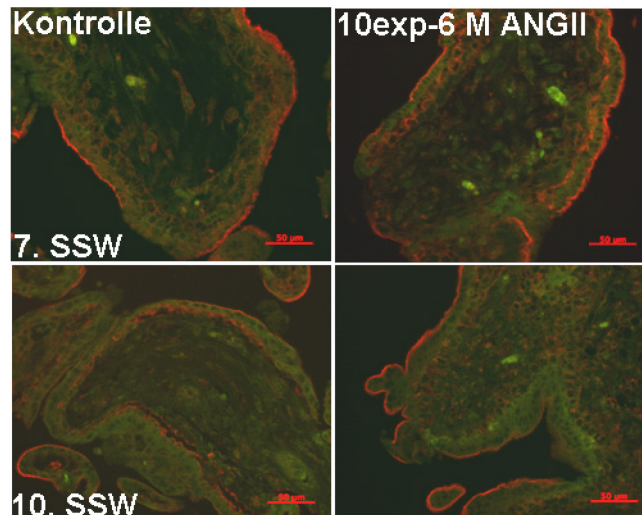
Mit Anti-Ki-67 immunhistochemisch gefärbte *explant*-Kulturen sind in Abbildung 48 dargestellt. Die Ki-67 Expression war nach Behandlung mit  $10^{-6}$  M ANGII nicht verändert.



**Abbildung 48. Ki-67 in *explant*-Kulturen der Plazenta**

Färbung gegen den Proliferationsmarker Ki-67 in humanen *explant*-Kulturen aus dem ersten Schwangerschaftsdrittel. Nach Stimulation mit  $10^{-6}$  M ANGII kam es zu keiner Veränderung der Ki-67 Expression. (Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ )

Ebenso wurde die Apoptose in humanen *explant*-Kulturen immunhistochemisch durch Einsatz eines gegen die aktivierte Caspase 3 gerichteten Antikörpers untersucht. Es konnte keine Veränderung in den mit ANGII behandelten *explant*-Kulturen nachgewiesen werden (s. Abb. 49).



**Abbildung 49. Aktivierte Caspase 3 in *explant*-Kulturen der Plazenta**

Färbung gegen den Apoptosemarker aktivierte (*cleaved*) Caspase 3 in humanen *explant*-Kulturen aus dem ersten Schwangerschaftsdrittel. Nach Stimulation mit  $10^{-6}$  M ANGII kam es zu keiner Veränderung der Expression. (Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m)

Untersucht wurde der Einfluss zweier ANGII Konzentrationen auf die Beweglichkeit, die Invasionsfähigkeit und die Apoptose der PL4 Trophoblastenzelllinie sowie auf die Migration, die Proliferation und die Apoptose von *explant*-Kulturen. ANGII erhöhte signifikant die Mobilität, die Migration und die Invasion, nicht aber die Apoptose- beziehungsweise Proliferationsrate.

## 7 Diskussion

### 7.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Für die PE+ Gruppe wurden für humanes Angiotensinogen transgene Rattenweibchen mit für humanes Renin transgenen Rattenmännchen verpaart. Am 21. Schwangerschaftstag waren lokales ANGI, ANGII und ANG1-7 in der uteroplazentaren Einheit und zirkulierendes ANGII im Plasma signifikant höher als in der WT und der PE- Gruppe. Der Blutdruck stieg im Verlauf der Schwangerschaft signifikant an und war signifikant erhöht zur WT Gruppe. Die Albuminausscheidung im Urin war am Ende der Schwangerschaft erhöht und *NGAL*, ein Marker für Nierenschädigung, wurde verstärkt exprimiert. Die Nierenhistologie zeigte Endothelzellschwellungen und Lipidablagerungen im Bereich der Glomeruli. Obwohl das Herzgewicht im Vergleich zur WT Gruppe unverändert war, wurden die Herzhypertrophiemarker *ANP* und *BNP* sowie die Herzfibrosemarker Kollagen 1, Fibronectin und *CTGF* am 21. Schwangerschaftstag verstärkt exprimiert. Trotz erhöhter Invasion von Trophoblasten im gesamten mesometrialen Dreieck war der Umbau der Spiralarterien in dilatierte Gefäße reduziert, wie durch eine erhöhte Persistenz von glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt werden konnte. Am Ende der Schwangerschaft wurden die Nachkommen charakterisiert: Sie waren durch asymmetrischen Kleinwuchs (*IUGR*) und hypertrophierte, nicht fibrosierte Herzen gekennzeichnet (s. Tabelle 8).

In der PE- Gruppe wurden für humanes Renin transgene Rattenweibchen mit für humanes Angiotensinogen transgenen Rattenmännchen verpaart. Das lokale uteroplazentare ANGI und ANGII wurde am 21. Schwangerschaftstag im Vergleich zur WT Gruppe vermehrt exprimiert, während ANG1-7 auf Niveau der WT Gruppe exprimiert wurde. Im Plasma war zirkulierendes ANGII unverändert zur WT Gruppe exprimiert. Der Blutdruck fiel im Verlauf der Schwangerschaft signifikant ab und war im Vergleich mit der WT Gruppe vermindert. Albuminurie und *NGAL* Expression in der Niere waren unauffällig. Verglichen mit der WT Gruppe war das Herzgewicht am Ende der Schwangerschaft vermindert. Die Herzhypertrophiemarker, nicht aber untersuchte Herzfibrosemarker, wurden verstärkt exprimiert. Die Invasion von Trophoblasten in das gesamte mesometriale Dreieck war leicht erhöht. Der Umbau der Spiralarterien, erhoben anhand der Persistenz glatter Gefäßmuskelzellen, lag zwischen dem der WT Gruppe und dem der PE+ Gruppe. Die Nachkommen waren

symmetrisch kleinwüchsig; im fötalen Herz wurden *ANP* und *BNP* vermehrt exprimiert, während die Fibrosemarker nicht reguliert waren (s. Tabelle 8).

Ab dem 9. Schwangerschaftstag wurde schwangeren Kontrollratten 435 ng/kg/min Angiotensin II per osmotischer Minipumpe verabreicht. Diese Tiere der ANGII + Gruppe zeigten eine unveränderte Expression der untersuchten RAS Komponenten am Ende der Schwangerschaft, lediglich lokales ANG1-7 wurde in der uteroplazentaren Einheit vermindert exprimiert. Der Blutdruck zeigte keine Veränderung über den Verlauf der Schwangerschaft und im Vergleich mit der WT Gruppe. Im Urin war die Albuminausscheidung erhöht, wohingegen die *NGAL* Expression in der Niere vermindert war. Ausschließlich die *ANP* Expression war erhöht, während Herzgewicht, *BNP* Expression und Fibrosemarker im Vergleich mit der WT Gruppe unverändert waren. Es konnten mehr Trophoblasten im mesometrialen Dreieck der ANGII + Gruppe als in der WT Gruppe nachgewiesen werden, während der *remodeling*-Prozess der Spiralarterien reduziert war. Die Nachkommen waren asymmetrisch kleinwüchsig; Marker für Hypertrophie und Fibrose waren im Herz runterreguliert (s. Tabelle 8).

Der ANGII ++ Gruppe wurde ab dem 9. Schwangerschaftstag 1 µg/kg/min Angiotensin II chronisch infundiert. Lokales ANG1 und ANG1-7 in der uteroplazentaren Einheit wurde vermindert gebildet, während lokales ANGII auf Niveau der WT Gruppe exprimiert wurde. Zirkulierendes ANGII im Plasma war im Vergleich mit der WT Gruppe erhöht. Der Blutdruck war im Verlauf der Schwangerschaft und im Vergleich zur WT Gruppe erhöht. Albuminurie trat verstärkt auf; die Expression von *NGAL* in der Niere war vermindert. Das mütterliche Herz war in der ANGII ++ Gruppe leichter als in der WT Gruppe; *ANP* und *BNP* wurden im Herz vermehrt gebildet. Obgleich der fehlenden statistischen Aussagekraft aufgrund der geringer Anzahl immunhistochemisch evaluierter uteroplazentarer Einheiten wurden die Ergebnisse in die Diskussion einbezogen. Die Trophoblasteninvasion in das gesamte mesometriale Dreieck war erhöht, die tiefe Trophoblasteninvasion in plazentafernen Spiralarterien war ebenso erniedrigt wie der *remodeling*-Prozess der Spiralarterien. Die Nachkommen waren von asymmetrischem Kleinwuchs betroffen; Herzhypertrophie- und Herzfibrosemarker waren im Vergleich mit der WT Gruppe weniger stark exprimiert (s. Tabelle 8).

**Tabelle 8. Zusammenfassung ausgewählter Ergebnisse**

Gegenüberstellung der Ergebnisse vom Ende der Schwangerschaft im Vergleich mit der Wildtyp Gruppe. (↑ erhöht, ↓ erniedrigt, ↔ unverändert)

	PE-	PE+	ANGII +	ANGII ++
Uteroplazentares ANGI	↑	↑	↔	↓
Uteroplazentares ANGII	↑	↑	↔	↔
Uteroplazentares ANG1-7	↔	↑	↓	↓
Plasma ANGII	↔	↑	↔	↑
Blutdruck	↓	↑	↔	↑
Albuminurie	↔	↑	↑	↑
NGAL Niere	↔	↑	↓	↓
Histologie Niere		pathologisch		
Gewicht Herz	↓	↔	↔	↓
Herzhypertrophie (Expression <i>ANP</i> , <i>BNP</i> )	↑	↑	ANP ↑	↑
Herzfibrose (Expression Kollagen 1, Fibronectin, <i>CTGF</i> )	↔	↑	↔	↔
Trophoblasteninvasion	↑	↑	↑	(↑)
tiefe Trophoblasteninvasion				(↓)
Umbau der Spiralarterien	↔/↓	↓	↓	(↓)
Kleinwuchs Nachkommen	sym- metrisch	asym- metrisch	asym- metrisch	asym- metrisch
Herzhypertrophie Nachkommen	↑	↑	↓	↓
Herzfibrose Nachkommen	↔	↔	↓	↓

In Zellkulturversuchen wurde der Einfluss von zwei unterschiedlichen ANGII Konzentrationen (ANGII  $10^{-6}$  M, ANGII  $10^{-8}$  M) auf Mobilität und Invasion einer extravillösen Trophoblastenzelllinie untersucht. ANGII erhöhte die Mobilität und die Anzahl der ausgewanderten Zellen beziehungsweise die zurückgelegte Strecke im Invasionsversuch. Die Migration extravillöser Trophoblasten wurde an *explant*-Kulturen des ersten Schwangerschaftstrimesters untersucht. ANGII erhöhte die Migration extravillöser Trophoblasten auf kollagenbeschichteten Zellkulturplatten. Apoptose und Proliferation villöser Trophoblasten wurde in *explant*-Kulturen durch Anfärbung von aktivierter Caspase 3 beziehungsweise Ki-67 untersucht; ANGII hatte auf keinen der untersuchten Parameter einen Einfluss. In einem weiteren Experiment

wurde der Einfluss von ANGII auf die Apoptose der extravillösen Trophoblastenzelllinie untersucht. ANGII konnte die durch  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{TNF}\alpha/\text{Actinomycin D}$  induzierte Apoptose nicht reduzieren, zeigte allerdings auch keine pro-apoptotischen Effekte.

## 7.2 Hintergrund

Die Multisystemerkrankung Präeklampsie betrifft zwischen 2-5% der Schwangerschaften in Europa und den USA und ist gekennzeichnet durch *de novo* auftretenden Bluthochdruck und Proteinurie.<sup>6</sup>

Präeklampsie ist an die Anwesenheit einer Plazenta gebunden. So liegt die Ursache der Erkrankung dann auch in einer abnormalen Plazentation: Während der normalen Schwangerschaft wandern Trophoblasten in mütterliches Gewebe ein, stellen im *remodeling*-Prozess die Spiralarterien weit und machen sie resistent gegenüber vasokonstriktorisches Substanzen. Bei Präeklampsie sind Trophoblasteninvasion und Umbau der Spiralarterien reduziert, sodass Plazenta und Fötus unterversorgt sind. Eine unterversorgte Plazenta setzt nun Faktoren frei, die zum Anstieg des Blutdrucks und Endorganschäden führen.<sup>8, 145</sup>

Absinken des Blutdrucks, Weitstellung der Blutgefäße, gesteigertes Plasmavolumen und physiologische Herzhypertrophie sind nur einige Anpassungen des Herz-Kreislauf-Systems an eine unauffällige Schwangerschaft. Während einer Präeklampsie sind diese Anpassungsmechanismen gestört, sodass der Blutdruck erhöht ist, die Gefäße verengt sind, der periphere Gefäßwiderstand erhöht ist und das Herz pathologisch hypertrophiert ist. Diese Veränderung des Herz-Kreislauf-Systems bei Präeklampsie sind nicht vollständig reversibel und tragen zur erhöhten Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen im späteren Leben bei.<sup>34, 36-38</sup>

Die typische histologische Veränderung der Niere bei Präeklampsie ist die glomeruläre Endotheliose.<sup>2</sup> *NGAL*, ein Biomarker für tubulären Nierenschaden, ist in Serum und Urin bei Präeklampsie erhöht.<sup>49</sup>

Ist die Plazentainsuffizienz bei Präeklampsie besonders stark ausgeprägt, sind die Nachkommen von *IUGR* betroffen.<sup>21</sup> Zudem haben Kinder, die aus präeklampsischen Schwangerschaften hervorgehen, ein erhöhtes Risiko, kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln.<sup>2</sup>



Unter dem Einfluss der Schwangerschaft entstehen zwei zusätzliche lokale Renin-Angiotensin-Systeme und die Komponenten des zirkulierenden Renin-Angiotensin-Systems verändern sich. Es wird vermutet, dass eine Dysregulation des lokalen und des zirkulierenden RAS an der Entstehung von Präeklampsie ursächlich beteiligt ist.<sup>68</sup>

### 7.3 Diskussion der Tiermodelle

#### 7.3.1 Expression des RAS

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde hochdosiertes Angiotensin II erstmalig chronisch und systemisch in schwangere Ratten infundiert.

Laut Definition einer Präeklampsie steigt der Blutdruck erstmalig im letzten Drittel der Schwangerschaft an,<sup>3</sup> sodass Substanzen, die hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Präeklampsie auszulösen, zwischen dem 9. und 13. Tag der Schwangerschaft in Mäusen oder Ratten getestet wurden. So wurden aktivierte Typ-1-T-Helferzellen erstmalig am 12. Schwangerschaftstag in schwangere Mäuse injiziert,<sup>146</sup> AT1AA wurden am 13. Schwangerschaftstag in schwangere Mäuse gespritzt<sup>94</sup> beziehungsweise ab dem 12. Schwangerschaftstag chronisch in Ratten infundiert<sup>93</sup> und *sFLT-1* wurde am 8. oder 9. Schwangerschaftstag injiziert.<sup>15</sup> Der 9. Schwangerschaftstag als früher Tag des oben genannten Zeitraumes wurde gewählt, damit die Entwicklung des mesometrialen Dreiecks ab dem 12. Schwangerschaftstag<sup>147</sup> vollständig unter erhöhtem zirkulierenden Angiotensin II erfolgen konnte. Ein weiteres Kriterium für die Wahl des Infusionsbeginns war die Vergleichbarkeit mit der PE+ Gruppe hinsichtlich erhöhter Angiotensin II Konzentration im Plasma und Blutdruckanstieg: Am 9. Schwangerschaftstag bewegte sich die zirkulierende Angiotensin II Konzentration in der PE+ Gruppe noch auf Niveau der WT Gruppe, sodass die Infusion von Angiotensin II vor dem 9. Schwangerschaftstag die Vergleichbarkeit mit der PE+ Gruppe beeinträchtigt hätte. In der ANGII ++ Gruppe stieg der Blutdruck etwas eher an als in der PE+ Gruppe; daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies zu den Unterschieden der beobachteten Phänotypen beiträgt.

Aufgrund der in Menschen und Ratten beschriebenen Resistenz gegenüber Angiotensin II während der Schwangerschaft<sup>70, 79</sup> und der Neuartigkeit des Experimentes gestaltete sich die Wahl der Angiotensin II Dosis schwierig. Ziel der

Angiotensin II Infusion war das Erreichen eines stabilen, mittleren arteriellen Bluthochdruckes im letzten Trimester der Schwangerschaft, vergleichbar mit dem der PE+ Gruppe. So wurde mit der bei Rattenmännchen getesteten hohen Angiotensin II Dosis von 435 ng/kg/min<sup>123, 125, 148</sup> begonnen, die in der schwangeren Ratte keinen Einfluss auf den Blutdruck zeigte. In Männchen führte diese Dosis immer zu einer stabilen Erhöhung des systolischen Blutdrucks um 70 mmHg,<sup>123, 125</sup> weswegen das Ausbleiben des Blutdruckanstieges auf die Angiotensin II Resistenz von Schwangeren zurückgeführt werden kann. Die in zwei Studien an männlichen Mäusen getestete Dosis von 1 µg/kg/min Angiotensin II<sup>126, 127</sup> wurde auf die schwangere Ratte übertragen mit der Folge, dass der mittlere arterielle Blutdruck von 92 mmHg an Tag 9 auf 125 mmHg an Tag 13 der Schwangerschaft anstieg. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Angiotensin II<sup>59</sup> wurde das Hormon mittels osmotischer Minipumpe chronisch infundiert und nicht nur einmalig injiziert.

Durch Einsatz transgener und infundierter Versuchstiergruppen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Modelle mit unterschiedlicher Expression zirkulierender und lokaler Renin-Angiotensin-Systeme geschaffen: In der PE+ Gruppe waren sowohl zirkulierendes als auch lokales uteroplazentares Angiotensin II erhöht, während in der PE- Gruppe ausschließlich lokales uteroplazentares Angiotensin II und in der ANGII ++ Gruppe ausschließlich zirkulierendes Angiotensin II erhöht waren.

Zum Anstieg von zirkulierendem Angiotensin II in der PE+ Gruppe haben unterschiedliche Faktoren beitragen: (1) Angiotensin II war bereits ab dem 9. Schwangerschaftstag lokal in der uteroplazentaren Einheit erhöht und konnte ins Plasma freigesetzt werden.<sup>67</sup> (2) Angiotensin I als Vorläufer von Angiotensin II war ab d15 erhöht. (3) Im Plasma wurden erhöhte Werte für humanes Angiotensinogen und erhöhte Konzentrationen für humanes Renin um den 14. Schwangerschaftstag nachgewiesen.<sup>97</sup> Die beiden Transgene humanes Renin und humanes Angiotensinogen wurden nachweislich in der Plazenta beider transgener Versuchstiergruppen exprimiert. Im Zusammenhang mit der Etablierung eines transgenen Mausmodelles für Präeklampsie konnte gezeigt werden, dass ausschließlich humanes Renin aus der Plazenta in die mütterliche Zirkulation freigesetzt werden konnte, während humanes Angiotensinogen in der Plazenta zurückgehalten wurde.<sup>76, 96</sup> Nur in der PE+ Gruppe, in der die Rattenmutter transgen für humanes Angiotensinogen war, war humanes Angiotensinogen im Plasma nachweisbar und konnte von humanem Renin gespalten werden.<sup>97</sup> Trotz Expression

beider Transgene in der uteroplazentaren Einheit der PE- Gruppe wurde zirkulierendes Angiotensin II lediglich auf Niveau der WT Gruppe exprimiert. In der PE- Gruppe ist die Mutter transgen für humanes Renin, sodass humanes Angiotensinogen nur in Plazenta und Fötus gebildet werden konnte und somit in der Zirkulation nicht als Substrat für humanes Renin zur Verfügung stand.<sup>97</sup>

Während der humanen Präeklampsie ist zirkulierendes Angiotensin II reduziert, lokales Angiotensin II in Plazentazotten allerdings vermehrt, was eine unabhängige Regulation lokaler und zirkulierender Angiotensin II Konzentrationen vermuten lässt.<sup>75</sup> Auch in den Versuchstiergruppen wurden Hinweise für eine unabhängige Regulation lokaler und zirkulierender Renin-Angiotensin-Systeme gefunden: So hatte zirkulierendes Angiotensin II in der WT, der PE- und der PE+ Gruppe sein Maximum am 15. Schwangerschaftstag, während lokales Angiotensin II in der uteroplazentaren Einheit in der PE+ Gruppe ab dem 15. Schwangerschaftstag und in der PE- Gruppe am 21. Schwangerschaftstag erhöht war. Das uteroplazentare Renin-Angiotensin-System kann in seine beiden Komponenten, das mütterliche mesometriale Dreieck und die fötale Plazenta unterteilt werden. In der PE+ Gruppe wurden erhöhte Angiotensin II Konzentrationen in Plazenta und mesometrialem Dreieck nachgewiesen, wohingegen in der PE- Gruppe nur in der Plazenta vermehrt Angiotensin II gefunden wurde. Dies bedeutet, dass humanes Angiotensinogen aus der Plazenta nicht ins mesometriale Dreieck freigesetzt oder mit den Trophoblasten hinein transportiert wird.<sup>98</sup>

Ratten-Angiotensinogen ist kein Substrat für humanes Renin, da das Ratten-RAS nicht mit dem humanen RAS und umgekehrt interagiert.<sup>95</sup> Trotzdem scheint es eine Art Rückkopplung zu geben, da Ratten-Renin im mesometrialen Dreieck der PE- und der PE+ Gruppe gleichermaßen geringer exprimiert wurde als in der WT Gruppe. In der Niere wird Renin durch Blutdruck und Angiotensin II reguliert. Beide Regulatoren sollten keinen Einfluss auf die Expression von Renin im mesometrialen Dreieck ausüben, da sich Blutdruck und lokales Angiotensin II im mesometrialen Dreieck in beiden Gruppen gegensätzlich verhalten.<sup>98</sup>

Angiotensin 1-7 mit seiner zu Angiotensin II antagonistischen Wirkweise wurde in der uteroplazentaren Einheit der PE+ Gruppe am Ende der Schwangerschaft vermehrt nachgewiesen. Dies kann einerseits an vermehrter Generierung aus Angiotensin I, das ab Tag 15 ebenfalls vermehrt war, liegen, andererseits auch am gesteigerten

Abbau von Angiotensin II, welches zum Ende der Schwangerschaft hin angestiegen war. Das *angiotensin-converting-enzyme 2* wird nachweislich in Plazenta, Dezidua und Myometrium des Menschen exprimiert.<sup>149</sup> Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass durch Wachstum der Gebärmutter als auch durch Hinzukommen der Plazenta als Produktionsort für ACE2 die ACE2 Expression und Aktivität während der Schwangerschaft erhöht war. Dies war unabhängig vom Blutdruck und einer salzhaltigen Diät.<sup>150</sup> Zur Abschätzung der ACE2 Aktivität wurde in Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit das Verhältnis von ANG1-7 zu seinem Vorläufer ANGII gebildet. In allen Versuchsgruppen kam es wie in der Literatur beschrieben zu einer Zunahme der ACE2 Aktivität im Verlauf der Schwangerschaft, die allerdings in der PE- und der PE+ Gruppe zeitlich verzögert zur WT Gruppe auftrat. Zusätzlich zur gesteigerten Angiotensin 1-7 Konzentration ist die vasodilatatorische Antwort auf Angiotensin 1-7 während der Schwangerschaft erhöht, wie eine Untersuchung mesenterialer Arterien der schwangeren und nicht schwangeren Ratte zeigte.<sup>79</sup> In Abhängigkeit der Konzentration der Angiotensin II Infusion war die Expression von Angiotensin 1-7 in der uteroplazentaren Einheit der ANGII+ und ANGII ++ Gruppe vermindert, während in der PE+ Gruppe die Angiotensin 1-7 Expression erhöht war. Damit unterscheiden sich die PE+ und die ANGII +/-++ Gruppe von einer Präeklampsie beim Menschen, die durch unveränderte Angiotensin 1-7 Konzentration im Bereich der Plazentazotten gekennzeichnet ist.<sup>75</sup>

Eine Limitation dieser Doktorarbeit ist, dass nicht untersucht wurde, ob die Angiotensin II-vermittelten Effekte durch Einsatz von ACE Hemmern oder AT1 Rezeptorblockern verhindert worden wären. Im transgenen Mausmodell wurde der Einfluss des AT1A-R untersucht, indem Weibchen, transgen für humanes Angiotensinogen aber ohne das Gen für den AT1A-R, mit Männchen, transgen für humanes Renin, gekreuzt wurden. Während der Schwangerschaft stiegen humanes Renin, Reninaktivität und Angiotensin I im Plasma an; Blutdruck, Kleinwuchs der Nachkommen sowie Abnormalitäten an Plazenta und Herz wurden hingegen nicht beobachtet.<sup>83</sup> Weiterhin wurde hypertensiven Weibchen, die humanes Angiotensinogen überexprimierten und mit Männchen, transgen für humanes Renin, verpaart waren, der AT1A-R Blocker TCV-116 am 18. und 19. Schwangerschaftstag oral verabreicht. Dadurch war der Bluthochdruck während dieser beiden Tage signifikant reduziert und das asymmetrische Wachstum der Föten war weniger stark ausgeprägt.<sup>83</sup>

### 7.3.2 Blutdruck

Hauptsymptom einer Präeklampsie ist der *de novo* Anstieg des Blutdrucks im letzten Drittel der humanen Schwangerschaft.<sup>8</sup> Sowohl in der PE+ Gruppe als auch in der ANGII ++ Gruppe kam es zum erstmaligen Anstieg des Blutdrucks während der Schwangerschaft.

In der PE+ Gruppe war der Blutdruck ab dem 13. Schwangerschaftstag erhöht, was dem Zeitraum entspricht, in dem zirkulierendes Angiotensin II vermehrt war. Gegen Ende der Schwangerschaft war der Angiotensin II Spiegel im Plasma im Vergleich zu Tag 15 reduziert, aber immer noch höher als Tag 9, sodass der Blutdruck ab dem 16. Schwangerschaftstag wieder absank, aber nicht das Ausgangsniveau erreichte. Mit der Angiotensin II Infusion wurde am 9. Tag der Schwangerschaft begonnen; der Blutdruck war bereits einen Tag später erhöht. Auch in der ANGII ++ Gruppe fiel der Blutdruck bereits vor Ende der Schwangerschaft ab.

In beiden Versuchsgruppen erfolgte der Blutdruckanstieg etwas eher als bei der humanen Präeklampsie, nämlich ab Tag 10 beziehungsweise Tag 13 der 21 bis 22 Tage dauernden Rattenschwangerschaft. Nach präeklampsischer Schwangerschaft fällt der Blutdruck nach Geburt beim Menschen innerhalb von 1-3 Tagen ab, war aber 13 Wochen nach Geburt noch leicht erhöht.<sup>44</sup> Warum der Blutdruck im Tiermodell bereits vor der Geburt abfiel, kann derzeit nicht erklärt werden. Auffällig war, dass der Blutdruck in beiden betroffenen Gruppen exakt 4 Tage nach erstmaligem Blutdruckanstieg abfiel. Die Veränderungen in der Höhe des Blutdrucks entsprachen denen der zirkulierenden Angiotensin II Konzentration, sodass erneut kompensatorische Mechanismen innerhalb des Renin-Angiotensin-Systems infrage kommen. So wurde zum Beispiel eine Reduktion der Ratten-Renin und Ratten-Angiotensinogen Expression im mesometrialen Dreieck der PE+ Gruppe beobachtet.<sup>98</sup> Auch die Transgene humanes Renin und Angiotensinogen fallen in der PE+ Gruppe am Ende der Schwangerschaft ab; dies scheint allerdings unabhängig von Blutdruck und Plasma Angiotensin II zu sein, da die Reduktion der Transgene auch in der PE- Gruppe beobachtet wurde.

Der mittels *tail-cuff* Methode gemessene Blutdruck im transgenen Mausmodell für Präeklampsie steigt ab dem 14. Schwangerschaftstag kontinuierlich an, erreicht sein Maximum von 156 mmHg an Tag 19 und fällt einen Tag vor Geburt wieder ab, um einen Tag nach der Geburt wieder den Ausgangsspiegel von vor der

Schwangerschaft zu erreichen.<sup>83, 96</sup> Die Höhe des erreichten Blutdruckmaximums war in der PE+ Gruppe und im Mausmodell vergleichbar, während der Blutdruck im Mausmodell über einen längeren Zeitraum erhöht war und erst kurz vor Geburt abfiel. Mögliche Auswirkungen der längeren Blutdruckerhöhung könnten die ausschließlich im Mausmodell beobachteten Krämpfe (15%) und Todesfälle (62%) der Versuchstiere sein.<sup>96</sup>

### 7.3.3 Nierenparameter

Bei Präeklampsie im Menschen tritt Proteinurie meist zusammen mit dem Bluthochdruck auf oder folgt diesem zeitlich leicht verzögert.<sup>47</sup>

Die Durchlässigkeit des glomerulären Filters hängt sowohl von der Größe der Moleküle als auch ihrer Ladung ab. Negativ geladenes Albumin mit einem Molekulargewicht von 66-69 kDa wird normalerweise zurückgehalten,<sup>151</sup> erscheint es dennoch im Primärharn, wird es in proximale Tubuluszellen rückresorbiert, sodass es nur in geringen Mengen im Urin erscheint.<sup>152</sup> In der PE+, der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe wurden erhöhte Albuminwerte im 24 Stunden Sammelurin nachgewiesen, sodass in allen drei Gruppen eine Nierenschädigung im Bereich des Glomerulus vorlag.

Bei Präeklampsie ist die Konzentration von *NGAL* in humanem Serum im Vergleich mit unauffälligen Schwangerschaften bereits im ersten Trimester erhöht, steigt zum zweiten Trimester weiter an und bleibt stabil erhöht bis zum Ende der Schwangerschaft.<sup>48</sup> Das bakteriostatische und zellprotektive Molekül *NGAL* wird von renalen Tubuluszellen als Antwort auf einen Schaden im Bereich des proximalen Tubulus exprimiert.<sup>49</sup> Es wurde bereits nachgewiesen, dass in den Primärharn filtrierte Albumin, wie unter anderem in der PE+ Gruppe gezeigt, eine toxische Wirkung auf den proximalen Tubulus ausüben kann und damit die Niere weiter schädigt sowie die Rückresorption vermindert.<sup>153</sup> In Übereinstimmung damit wurde *NGAL* in der Niere der PE+ Gruppe vermehrt exprimiert. In der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe hingegen war die Expression von *NGAL* vermindert. Dieser Effekt widerspricht der in unserer Arbeitsgruppe gemachten Beobachtung, dass chronische Angiotensin II Infusion in männlichen Mäusen *NGAL* um den Faktor zwei hochreguliert. Auch war die Albuminurie in der ANGII ++ Gruppe besonders ausgeprägt, sodass *NGAL* als zellprotektives Molekül stärker exprimiert werden sollte. Dies spricht für eine Entkopplung der in der Fachliteratur als positiv

korrelierend beschriebenen Marker einer Nierenschädigung *NGAL* und Albuminurie.<sup>154, 155</sup>

Tiere der ANGII + Gruppe hatten trotz chronischer Angiotensin II Infusion keine nachweisbaren, erhöhten Angiotensin II Spiegel im Plasma und keinen Bluthochdruck. Trotzdem wurde Albumin im Urin auf Höhe der Albuminspiegel der PE+ Gruppe gefunden. Es wurde gezeigt, dass zirkulierendes Angiotensin II aktiv in die Niere aufgenommen werden kann und dort akkumuliert, was zur beobachteten Albuminurie in der ANGII + Gruppe beitragen kann und gleichzeitig die im Plasma gemessene Angiotensin II Konzentration erklären würde.<sup>156</sup>

Eine glomeruläre Endotheliose ist die charakteristische Veränderung der Niere bei Präeklampsie. Sie ist durch die Ablagerung von Fibrin, das Auftreten von geschwollenen Endothelzellen und einer Verwischung der Endothelfensterchen gekennzeichnet.<sup>47</sup> In der PE+ Gruppe konnte eine Schwellung der Endothelzellen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten die Nieren der PE+ Gruppe erhöhte Fibrin- und Ig G-Ablagerung im Bereich der Glomeruli und vermehrte Einlagerung von Kollagen 1 um die Tubuli und im Interstitium.<sup>18</sup> Dies konnte weder in der WT Gruppe noch in der PE- Gruppe beobachtet werden und spricht für einen pathologischen Nierenphänotyp.

#### 7.3.4 Herzparameter

Durch die Schwangerschaft stiegen das Körpergewicht der WT und der PE- Gruppe signifikant an; das Herzgewicht war in der WT und der PE+ Gruppe signifikant erhöht. Einen ersten Hinweis auf einen pathologischen Herzphänotyp in der PE+ Gruppe ergab der nachgewiesene Anstieg des Herzgewichtes im Zusammenhang mit dem Fehlen einer Körpergewichtszunahme. Das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht ist ein weit verbreiteter Index für Herzhypertrophie, der bei einer leichten Herzhypertrophie um 15% und bei einer schweren Herzhypertrophie um 50% ansteigen kann. Während der Schwangerschaft steigt das Herzgewicht an; der Herzhypertrophie Index ist nicht erhöht aufgrund des ebenfalls erhöhten Körpergewichts. Daher wird die durch eine Schwangerschaft verursachte Herzhypertrophie als physiologische und kompensatorische Antwort des Herzens betrachtet.<sup>38</sup> Auf die Darstellung des Indexes wurde verzichtet, da aufgrund der unterschiedlichen Körpergewichte der Tiergruppen vor Eintritt der Schwangerschaft die erreichten Gewichte am Ende der Schwangerschaft ebenfalls zwischen den

Tiergruppen variierten und falsch-positive Indizes generierten. Während die Anzahl der Nachkommen zwischen den Tiergruppen vergleichbar waren, variierte das Gewicht der Föten zwischen der Versuchstiergruppen signifikant, was ebenfalls bedacht werden sollte, wenn das Körpergewicht der Muttertiere diskutiert wird.

Mittels Echokardiographie wurden die Herzen von normotensiven, schwangeren Frauen und Schwangeren mit Präeklampsie untersucht: In der Kontrollgruppe wurde eine linksventrikuläre Hypertrophie, gekennzeichnet durch 11% Zunahme der Wandstärke und 23% Zunahme der linksventrikulären Masse, nachgewiesen, die nach Entbindung vollständig reversibel war. Diese linksventrikuläre Hypertrophie trat bei Präeklampsie verstärkt auf. So waren die linksventrikuläre Masse und das Verhältnis von Wanddicke zum Herzkammerdiameter erhöht, verglichen mit der Kontrollgruppe. Zudem waren diese Veränderungen nach Entbindung nicht vollständig reversibel.<sup>44</sup> In der PE+ Gruppe haben sich wie beschrieben Hinweise auf eine Hypertrophie der Ventrikel ergeben, wobei die Versuchstiere und ihre Herzen lediglich gewogen und nicht mittels Echokardiographie untersucht wurden. Im transgenen Mausmodell für Präeklampsie wurde anhand von Querschnitten gezeigt, dass das Herz im Vergleich mit der Kontrollgruppe konzentrisch hypertrophiert war.<sup>96</sup>

Verglichen mit dem Herz von nicht schwangeren Frauen hypertrophiert das Herz im Verlauf der normalen Schwangerschaft physiologisch: Dabei werden klassische Hypertrophiemarker wie *ANP* und *BNP* nicht vermehrt exprimiert; *BNP* wird am Ende der Schwangerschaft sogar vermindert exprimiert.<sup>37</sup> Dies konnte bereits im Rattenmodell bestätigt werden.<sup>39</sup> In Übereinstimmung damit waren in der WT Gruppe die Expressionen von *ANP*, *BNP* und allen untersuchten Fibrosemarkern in der Schwangerschaft signifikant geringer exprimiert als vor Eintritt der Schwangerschaft. Bei Präeklampsie kommt es zu einer pathologischen Herzhypertrophie.<sup>38</sup> Unter dem Einfluss der Schwangerschaft stieg in der PE+ Gruppe die Expression des Akutmarkers *ANP* im Herz an, während die Expression von *BNP* unverändert blieb. Untersuchte Fibrosemarker wurden in der PE+ Gruppe aufgrund des Einflusses der Schwangerschaft unverändert oder vermindert exprimiert.

Bei Präeklampsie wurden in humanem Plasma höhere *ANP* Spiegel bestimmt als im Plasma unauffälliger Schwangerschaften. *ANP* wirkt als Gegenspieler von Angiotensin II vasodilatatorisch und bewirkt eine geringe Reduktion des Blutdrucks.<sup>34</sup> Im Vergleich mit der WT Gruppe zeigte sich am Ende der Schwangerschaft, dass in



der PE+ Gruppe die Expressionen von *ANP* und *BNP*, erhöht waren. In der PE+ Gruppe war zirkulierendes Angiotensin II erhöht; zusätzlich wurde humanes Angiotensinogen im Herz exprimiert, wo es als Substrat für aus der Plazenta freigesetztes humanes Renin<sup>97</sup> zur Verfügung stand. Die Versuchstiere der ANGII ++ Gruppe, die lediglich erhöhte zirkulierende Angiotensin II Spiegel hatten, zeigten einen geringeren Anstieg der *ANP* Expression und einen vergleichbaren Anstieg der *BNP* Expression. Auch in der PE- Gruppe kam es zu einem im Vergleich zur PE+ Gruppe geringerem Anstieg der *ANP* Expression und einem vergleichbaren Anstieg der *BNP* Expression, obwohl sowohl Blutdruck als auch zirkulierendes und uteroplazentares Angiotensin II der WT Gruppe entsprechend waren.

Die Entstehung einer Herzhypertrophie kann durch Zunahme des Volumens der Kardiomyozyten beziehungsweise Ablagerung von Bindegewebe verursacht werden.<sup>40</sup> In der PE+ Gruppe wurde sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene eine Zunahme der Fibrosierung des Herzens nachgewiesen, die in allen anderen Versuchsgruppen nicht beobachtet wurde. Von besonderem Interesse war der Unterschied zwischen der nachgewiesenen Fibrosierung in der PE+ Gruppe und der fehlenden Zunahme der Fibrosierung in der ANGII ++ Gruppe. Zu diesem Unterschied wird beitragen, dass zirkulierendes Angiotensin II in der PE+ Gruppe am Tag 15 stark erhöht war und am 21. Schwangerschaftstag auf Niveau der Expression der ANGII ++ Gruppe abfiel, während bei der ANGII ++ Gruppe davon ausgegangen werden kann, dass zirkulierendes Angiotensin II stabil über den gesamten Zeitraum auf dem Niveau vom 21. Schwangerschaftstag exprimiert war.

An Wistar Ratten konnte gezeigt werden, dass Schwangerschaft das Herz der Versuchstiere vor Angiotensin II Effekten schützt: Im Vergleich zu nicht schwangeren Kontrolltieren, denen Angiotensin II in einer Dosis von 150 ng/kg/min per osmotischer Minipumpe infundiert wurde, wurden in schwangeren, ebenfalls mit Angiotensin II infundierten Ratten weniger Kollagenablagerung, erhöhte Gefäßdichte sowie geringer *BNP*, Kollagen 1 und Kollagen 3 Expression nachgewiesen.<sup>157</sup>

Im Vergleich mit unauffälligen Schwangerschaften konnte im *RUPP*-Rattenmodell gezeigt werden, dass die Kardiomyozyten vergrößert sind und Marker für Herzhypertrophie sowie Fibrose vermehrt exprimiert werden. Diese Effekte waren abhängig von  $\text{TNF}\alpha$ , da der Einsatz von Etanercept die beobachteten Effekte verminderte.<sup>158</sup> Die Ursache für die im Gegensatz zu den im Rahmen der

vorliegenden Doktorarbeit erhobenen Daten wird die unterschiedliche Induktion der Präeklampsie sein: Durch definierte, partielle Verengung von Aorta und Ovarialarterien am 14. Schwangerschaftstag wurde in der *RUPP*-Ratte ein Blutdruckanstieg auf 122 mmHg an Tag 19 erreicht<sup>80</sup> während in der PE+ Gruppe eine Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks von 102 mmHg an Tag 13 auf 151 mmHg an Tag 16 erreicht wurde. In der PE+ Gruppe stieg der Blutdruck zwar auf höhere Werte an, war dafür aber über einen kürzeren Zeitraum erhöht. Dementsprechend war in der PE+ Gruppe der akute Marker einer Herzhypertrophie *ANP* erhöht, während der chronische Marker *BNP* nicht vermehrt exprimiert wurde. Eine Bestimmung der  $\text{TNF}\alpha$  Konzentration im Plasma der PE+ Gruppe würde zur Aufklärung der beobachteten unterschiedlichen Effekte beitragen.

Hypertensive Mäuse, doppelt transgen für humanes Angiotensinogen und humanes Renin, zeigten während der Schwangerschaft einen weiteren Blutdruckanstieg und *de novo* Proteinurie. Ihr Herzhypertrophie Index, dargestellt als Verhältnis aus Herzgewicht zu Körpergewicht, und die Expression von *BNP* waren bereits vor der Schwangerschaft erhöht, stiegen aber im Verlauf der Schwangerschaft weiter an.<sup>100</sup> Im Gegensatz zur PE+ Gruppe waren diese doppelt transgenen Mäuse bereits vor der Schwangerschaft hypertensiv aufgrund hoher zirkulierender Renin- und Angiotensin II Konzentrationen und stellen daher eher ein interessantes Modell für Pfortgestose als für Präeklampsie dar.

### 7.3.5 Uteroplazentare Einheit

Das Gewicht einer humanen Plazenta dient als Indikator für ihre Funktionalität; so wird eine kleine Plazenta als weniger funktionstüchtig beschrieben. Weiterhin sind Plazentagewicht und Kleinwuchs der Nachkommen positiv korreliert, während das Risiko für Präeklampsie trotz geringem Plazentagewicht nicht erhöht ist.<sup>159</sup> In beiden transgenen Versuchstiergruppen (PE-, PE+) und der ANGII ++ Gruppe war das Gewicht der uteroplazentaren Einheit am Ende der Schwangerschaft vermindert, ebenso wie das Körpergewicht der Nachkommen vermindert war. Beide Parameter waren in der hypertensiven PE+ und ANGII ++ Gruppe besonders stark ausgeprägt.

Histologische Untersuchungen humaner Biopsien der Dezidua zeigten, dass Präeklampsie mit der verminderten Invasion endovaskulärer Trophoblasten und Ausbleiben des physiologischen Umbaus der Spiralarterien assoziiert war.<sup>28</sup> Der physiologische Umbau der Spiralarterien während der humanen Schwangerschaft

erfolgt in mehreren Schritten zwischen der 6. und 18. Schwangerschaftswoche: (1) Im Endothel entstehen Vakuolen und durch Anschwellung der glatten Gefäßmuskelzellen erscheint die *tunica media* verstärkt. (2) Interstitielle Trophoblasten wandern zu den glatten Gefäßmuskelzellen der Spiralarterien und bringen die Ordnung ihrer Lagen durcheinander. (3) Endovaskuläre Trophoblasten sind erstmalig im Lumen der Spiralarterien nachweisbar und lösen das Endothel auf. (4) Trophoblasten werden in die *tunica media* eingebettet, ersetzen glatte Gefäßmuskelzellen und sezernieren Fibrinoid. (5) Das Endothel wird aus endovaskulären Trophoblasten, die nun endothelzellspezifische Faktoren (Adhäsionsmoleküle, angiogene Faktoren) exprimieren, reorganisiert und der Bereich zwischen Endothel und Trophoblasten durch Einlagerung von myointimalen Zellen verstärkt. Um die 20. Schwangerschaftswoche ist der *remodeling*-Prozess beendet und der mütterliche Blutstrom kann die wachsenden intervillösen Räume ausreichend mit Blut versorgen.<sup>29</sup> Auch in der Ratte sind Fibrinoidablagerung und Abbau von Endothelzellen sowie glatten Gefäßmuskelzellen Charakteristika eines erfolgreichen Umbaus der Spiralarterien. Die Analyse des *remodeling*-Prozesses in der uteroplazentaren Einheit der Ratte erfolgte am 21. Schwangerschaftstag, an dem der Umbau der Spiralarterien bereits abgeschlossen war.<sup>27</sup>

Verglichen mit der Kontrollgruppe wurden am 21. Schwangerschaftstag im gesamten mesometrialen Dreieck der PE-, der PE+, der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe mehr Trophoblasten in der Wand der Spiralarterien nachgewiesen, wobei in der PE- Gruppe die Menge eingewanderter Trophoblasten signifikant geringer war als in der PE+ und der ANGII + Gruppe. Die erhöhte Trophoblasteninvasion in den transgenen sowie mit Angiotensin II behandelten Versuchsgruppen steht im Widerspruch zur humanen Präeklampsie, bei der die Invasion nicht erhöht ist.<sup>29</sup> Eine immunhistochemische Analyse der tiefen Trophoblasteninvasion in plazentafernen Spiralarterien des mesometrialen Dreiecks am 21. Schwangerschaftstag zeigte eine im Vergleich zur WT Gruppe vermindert tiefe Invasion von Trophoblasten in der ANGII ++ Gruppe. In der PE+ und PE- Gruppe wurde das Trophoblastenvorkommen am 21. Schwangerschaftstag bereits in früheren Studien quantifiziert: Im Vergleich mit der Kontrollgruppe waren in der PE+ Gruppe signifikant mehr Trophoblasten in der Wand plazentaferner Spiralarterien nachweisbar, dies galt nicht für die PE- Gruppe.<sup>144</sup>

In der PE+ Gruppe, die durch hohe zirkulierende und hohe uteroplazentare Angiotensin II Spiegel charakterisiert war, war die Invasion von Trophoblasten in das gesamte mesometriale Dreieck, aber auch die tiefe Invasion in plazentafernen Spiralarterien erhöht. In der ANGII ++ Gruppe hingegen war ausschließlich zirkulierendes Angiotensin II erhöht, sodass die Invasion von Trophoblasten ins gesamte mesometriale Dreieck erhöht, die tiefe Trophoblasteninvasion in plazentaferne Bereiche hingegen reduziert war. In der PE- Gruppe war nur uteroplazentares Angiotensin II am Ende der Schwangerschaft signifikant erhöht und in der Ausprägung nicht so stark wie in der PE+ Gruppe. Daher war die Trophoblasteninvasion im gesamten mesometrialen Dreieck bloß leicht erhöht im Vergleich zur WT Gruppe, wodurch auch die tiefe Invasion geringer ausfiel als in der PE+ Gruppe. Über die bereits diskutierte unterschiedliche Regulation zirkulierender und lokaler Renin-Angiotensin-Systeme<sup>75</sup> hinausgehend, konnte anhand der aufgeführten Ergebnisse gezeigt werden, dass zirkulierendes und uteroplazentares Angiotensin II die Invasion von Trophoblasten unterschiedlich beeinflussten. So schien lokales, uteroplazentares Angiotensin II für die tiefe Invasion von Trophoblasten in plazentafernen Spiralarterien relevant gewesen zu sein, während zirkulierendes Angiotensin II die Trophoblasteninvasion eher diffus zu beeinflussen schien.

Um eine Weitstellung der Spiralarterien zu erreichen, müssen Trophoblasten nicht nur vermehrt ins mesometriale Dreieck einwandern, sondern die Spiralarterien im *remodeling*-Prozess umbauen. Untersuchte Kennzeichen eines positiven *remodeling*-Prozesses sind Fibrinoidablagerung sowie Abbau glatter Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen.<sup>27</sup> In Übereinstimmung mit dem am 21. Schwangerschaftstag stark vermehrten Trophoblastenvorkommen im gesamten mesometrialen Dreieck der PE+, der ANGII + und der ANGII ++ Gruppen wurde eine vermehrte Ablagerung von Fibrinoid in der Spiralarterienwand nachgewiesen. Der Anteil der Endothelzellen an der Spiralarterienwand blieb in allen Versuchsgruppen unverändert. Ursächlich könnte die während des physiologischen Umbaus der Spiralarterien beschriebene Re-Endothelialisierung sein oder das Endothel wurde gar nicht erst aufgelöst. Die Schicht der glatten Gefäßmuskelzellen konnte im Vergleich zur WT Gruppe in der PE+ und beiden mit Angiotensin II infundierten Gruppen nur ansatzweise aufgelöst werden. In der WT Gruppe spricht der niedrige Anteil glatter Gefäßmuskelzellen an der Spiralarterienwand für einen erfolgreichen Umbau der Gefäße, sodass der hohe

Anteil an Endothelzellen auf mütterliche Reparaturmechanismen zurückgeführt werden kann. In der PE- Gruppe lag der Anteil glatter Gefäßmuskelzellen zwischen dem der WT Gruppe und dem der restlichen Versuchsgruppen. In der PE+, der ANGII + und tendenziell auch in der ANGII ++ Gruppe war die Schicht der glatten Gefäßmuskelzellen kompakt, sodass ein Umbau der Spiralarterien nur teilweise erfolgte und der hohe Anteil an Endothelzellen darauf zurückzuführen ist, dass sie gar nicht erst abgebaut wurden. Ergebnis eines zum Teil erfolglosen *remodeling*-Prozesses war ein eingeschränkter Blutfluss zur Plazenta, sodass die Nachkommen unzureichend versorgt wurden und von Kleinwuchs betroffen waren. Ob die vermehrte Invasion von Trophoblasten im Tiermodell, besonders die beobachtete tiefe Invasion in der PE+ Gruppe, eine Kompensation zum reduzierten *remodeling*-Prozess darstellt, muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Dazu wäre eine genaue Unterscheidung zwischen Trophoblasten, die Endothelzellmarker exprimieren, und Endothelzellen notwendig. Ebenso wäre die Bestimmung der Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems im Fötus notwendig, um die These eines Angiotensin II Gradienten zwischen Fötus, Plazenta, mesometrialem Dreieck und Mutter zu untermauern.

Im *RUPP*-Rattenmodell konnten hinsichtlich der Trophoblasteninvasion keine Unterschiede zur Kontrollgruppe festgestellt werden, weder bei Untersuchung des gesamten mesometrialen Dreiecks noch bei Analyse der tiefen Trophoblasteninvasion in plazentafernen Spiralarterien. Auch die Charakteristika des *remodeling*-Prozesses wie Fibrinoidablagerung, Endothel- und Gefäßmuskulaturabbau, waren unverändert zur Kontrollgruppe. (Doktorarbeit Nele Geusens, Leuven, Belgien, 2010) Dieser deutliche Unterschied zum transgenen Rattenmodell weist auf den Einfluss des Renin-Angiotensin-Systems auf das Trophoblastenverhalten hin und wurde daher in weiterführenden Zellkulturexperimenten untersucht, die später ausführlich diskutiert werden.

Verletzungen der Plazentagefäße bei Präeklampsie und *IUGR* ähneln dem Anfangsstadium einer Arteriosklerose und werden daher akute Atherose genannt. Akut deshalb, weil die Verletzung innerhalb der kurzen Zeit der Schwangerschaft entsteht, während sich die klassische Arteriosklerose über Jahre hinweg entwickelt. Akute Atherose ist charakterisiert durch Lymphozyteninfiltration, lipidgefüllte Schaumzellen (CD 68 positive Makrophagen) und Nekrosen. Folge der akuten Atherose ist eine Verengung der betroffenen Blutgefäße, die zu Dysfunktionen und

oxidativem Stress beitragen.<sup>160</sup> Angiotensin II ist auf verschiedene Arten in die Entstehung und Progression von Arteriosklerose involviert: So fördert Angiotensin II die Entstehung oxidativer Spezies, die die endotheliale Dysfunktion und den programmierten Zelltod von Endothelzellen fördern. Weiterhin verstärkt Angiotensin II Proliferation, Migration und Wechsel des Phänotypes von glatten Gefäßmuskelzellen, was zur Freisetzung extrazellulärer Matrix und Wachstumsfaktoren führt.<sup>161</sup> Daher wurden in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe die Gefäße im mesometrialen Dreieck untersucht: In einigen Bereichen der Gefäße des mesometrialen Dreiecks der transgenen Versuchstiergruppen (PE-, PE+) konnten Nekrosen sowie wenige und degenerative Trophoblasten nachgewiesen werden, während Schaumzellen und Plazentainfarkte nicht gefunden wurden. Diese Faktoren können zusätzlich zum beobachteten Kleinwuchs der Nachkommen beigetragen haben.<sup>18</sup>

### 7.3.6 Nachkommen

Um zwischen gesunden *SGA* (*small for gestational age*) Neugeborenen, die lediglich klein sind, und *IUGR* (*intrauterine growth restriction*) Neugeborenen, die ihr Wachstumspotential *in utero* nicht erfüllen konnten, zu unterscheiden, wurden Hirn- und Lebergewicht bestimmt.<sup>53</sup> Entsprechend der Barker Hypothese wird bei einem unterversorgten Fötus das Gehirn bevorzugt versorgt, während die Versorgung von Leber, Niere und Muskulatur zugunsten der erstgenannten Organe reduziert wird.<sup>55</sup>

In Übereinstimmung mit der humanen Präeklampsie wurde in der ANGII ++ Gruppe eine reduzierte tiefe Trophoblasteninvasion und ein verminderter *remodeling*-Prozess an den Spiralarterien nachgewiesen. Dies spiegelte sich in einem verminderten Gewicht der Plazenta wider und sorgte für eine Unterversorgung des Fötus mit Sauerstoff und Nährstoffen. Nicht nur das Körpergewicht der Föten war reduziert, sondern auch das Verhältnis von Hirngewicht zu Lebergewicht war erhöht, sodass das Kriterium für eine *IUGR* erfüllt war. Das Hirngewicht der Nachkommen der ANGII ++ Gruppe war zwar reduziert, das Lebergewicht war aber im Vergleich mit den Nachkommen der WT Gruppe viel stärker vermindert. In Übereinstimmung mit der Barker Hypothese<sup>55</sup> kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass Hirnentwicklung und Hirnwachstum auf einer höheren Hierarchiestufe stehen als die Entwicklung der Leber. Der *brain-sparing* Effekt beschreibt die adaptive Antwort eines kleinwüchsigen Föten auf eine Plazentainsuffizienz, welche darin besteht, dem zentralen Nervensystem durch Weitstellung zerebraler Gefäße bevorzugt Blut

zuzuführen, um die Sauerstoffversorgung so gut wie möglich aufrecht zu erhalten.<sup>162</sup> Untersuchungen an Kleinkinder, bei denen der *brain-sparing* Effekt pränatal nachgewiesen wurde, haben gezeigt, dass diese Kinder stärkere Verhaltensauffälligkeiten zeigten als Kinder ohne pränatalen *brain-sparing* Effekt. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass der *brain-sparing* Effekt das Gehirn nicht vollständig schützen konnte.<sup>163</sup> Dies könnte das im Vergleich zu den Nachkommen der WT Gruppe erniedrigte Hirngewicht der Nachkommen der ANGII ++ Gruppe erklären.

In der PE- Gruppe wanderten weniger Trophoblasten weniger tief in das mesometriale Dreieck ein als in der PE+ Gruppe; der *remodeling*-Prozess war aber nicht so reduziert wie in der PE+ Gruppe. Dementsprechend waren auch Plazenta- und Körpergewicht im Vergleich mit der WT Gruppe nur leicht reduziert. Sowohl Hirngewicht als auch Lebergewicht waren in den Nachkommen der PE- Gruppe gleichermaßen leicht reduziert, sodass der Quotient aus beiden Gewichten nicht verändert war. Diese Tiere waren nicht von *IUGR* betroffen. Der symmetrische Kleinwuchs der Föten der PE- Gruppe kann durch den zur WT Gruppe verminderten Umbau der Spiralarterien verursacht sein, wobei der *remodeling*-Prozess nicht so stark reduziert war, als dass er einen asymmetrischen Kleinwuchs der Föten hätte verursachen können.

In der PE+ Gruppe wurde eine vermehrte tiefe Trophoblasteninvasion, aber ebenfalls eine reduzierter Umbau der Spiralarterien nachgewiesen. Da das Gewicht der Plazenta und des Fötus reduziert waren, entspricht die vermehrte Trophoblasteninvasion wohl einem kompensatorischen Mechanismus für den reduzierten *remodeling*-Prozess. Der Versuch der Kompensation war nur begrenzt erfolgreich, da auch die Föten der PE+ Gruppe von *IUGR* betroffen waren, wie ihr erhöhtes Verhältnis von Hirngewicht zu Lebergewicht zeigte, wobei ihre Hirngewicht weniger stark reduziert war als das der Nachkommen der ANGII ++ Gruppe.

Verglichen mit den Nachkommen der WT Gruppe war das Hirngewicht der Nachkommen der PE-, der PE+, der ANGII + und der ANGII ++ Gruppe reduziert. Die Nachkommen aus humanen Schwangerschaften mit Präeklampsie wurden in einer Studie untersucht und zeigten ein erhöhtes Risiko für Schlaganfall. Bei Geburt fielen die später Betroffenen durch einen geringeren Kopfumfang auf. Als Ursache für das erhöhte Schlaganfallrisiko diskutierten die Autoren Veränderungen der

Blutgefäße im Gehirn als Konsequenz der reduzierten oder beeinträchtigten Hirnwachstums *in utero*.<sup>164</sup>

Ähnlich zum Schutz des Gehirns bei Mangelversorgung des Fötus<sup>55</sup> wird auch das Herz bevorzugt versorgt. Veränderungen der Nachlast, die den Druck im linken und rechten Herz maßgeblich mitbestimmen, beeinflussen das Blutvolumen, welches dem Fötus für die Versorgung von Herz und Gehirn zur Verfügung steht. Eine Erhöhung der Nachlast hinter der rechten Herzkammer oder eine Reduktion der Nachlast hinter der linken Herzkammer führen zu einer bevorzugten Verteilung des Blutvolumens in Richtung der linken Herzkammer und damit in Richtung der Koronarien.<sup>165</sup> Trotzdem wurde in den Nachkommen aller Versuchsgruppen eine Reduktion des Herzgewichtes nachgewiesen. Wie das Hirngewicht war auch das Herzgewicht in den Föten der ANGII ++ Gruppe besonders stark vermindert; Herzhypertrophie- und Fibrosemarker waren runterreguliert. Dies lässt erneut darauf schließen, dass der verantwortliche Mechanismus ein anderer ist als in den transgenen Gruppen. In der ANGII ++ Gruppe war zirkulierendes Angiotensin II ab dem 9. Schwangerschaftstag erhöht und wirkte unter anderem auf die uteroplazentare Einheit ein. In *ex vivo* Plazentaperfusionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine Infusion mit  $10^{-10}$  M und  $10^{-11,5}$  M Angiotensin II zur Konstriktion der Plazentagefäße führte,<sup>166</sup> was Veränderungen in Trophoblasteninvasion und *remodeling*-Prozess nach sich zog ebenso wie ein asymmetrische Wachstum des Fötus.

In den transgenen Gruppen, in denen uteroplazentares Angiotensin II erhöht war, fiel die Reduktion des Herzgewichtes der Föten nicht so stark aus wie in der ANGII ++ Gruppe. Eine Untersuchung der Herzhypertrophie marker ergab eine Zunahme der *ANP* und *BNP* Expression, trotz des leichteren Herzens. Die Fibrosemarker waren hingegen nicht dysreguliert. Die Nachkommen der PE- und der PE+ Gruppe exprimieren zusätzlich zum Ratten Renin-Angiotensin-System auch humanes Renin und humanes Angiotensinogen. In den dTGR (humanes Angiotensinogen, humanes Renin) Nachkommen der PE- Gruppe (Mutter hREN, Vater hAGT) wurde die Expression von humanem Renin in Niere, Nebenniere, Aorta, Muskulatur, Milz, Ovar und Lunge bestätigt, während humanes Angiotensinogen in allen untersuchten Geweben gefunden wurde. Die dTGR (hAGT, hREN) sterben im Alter von circa 7 Wochen. Zu diesem Zeitpunkt war ihr Blutdruck signifikant erhöht (mittlerer arterieller Blutdruck 200 mmHg), das Herz hypertrophiert und die Niere pathologisch



verändert.<sup>167</sup> In einer weiteren Studie wurden erhöhte Angiotensin II Plasmaspiegel, hohe humane Plasmareninaktivität und hohe Expression von humanem Angiotensinogen im Plasma 4 Wochen alter dTGR (hAGT, hREN) nachgewiesen.<sup>168</sup> Die Nachkommen der PE+ Gruppe (Mutter hAGT, Vater hREN), die dTGR (hREN, hAGT) sind weniger gut charakterisiert. Eigene Untersuchungen ergaben eine vergleichbare Expression von humanem Angiotensinogen im Herz der Nachkommen der PE- und der PE+ Gruppe direkt nach deren Geburt. Humanes Renin wurde nicht im Herz exprimiert. Generell wird Renin mRNA lediglich in einigen Teilen des Herzens in sehr geringem Maße exprimiert. Zirkulierendes Renin und Prorenin muss daher aktiv vom Herz aufgenommen werden und ist hauptverantwortlich für die Generation von Angiotensin I.<sup>169</sup> Dies spricht für erhöhte Angiotensin II Spiegel in den Herzen der dTGR, die die beobachtete Überexpression der Herzhypertrophiemarker erklären würde.

Nachkommen von humanen Schwangerschaften mit Präeklampsie haben im späteren Leben ein erhöhtes Risiko, an kardiovaskulären Erkrankungen, wie Bluthochdruck, Schlaganfall und koronare Herzerkrankungen, zu leiden.<sup>2</sup> Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine durch Angiotensin II ausgelöste Präeklampsie für asymmetrisches Wachstum der Föten verantwortlich war, die so stark ausgeprägt war, dass ihr Herz verkleinert war. Das Wachstum des Föten erfolgt durch Zellteilung und diese ist abhängig von Sauerstoff und Nährstoffen. Selbst kurze Perioden der Unterversorgung können die Zellanzahl in Organen reduzieren, da es für jedes Organ spezifische, kritische Wachstumszeiträume gibt. Dies ist eine wichtige Adaptation, weil es den späteren Bedarf an Nahrungsmitteln reduziert. Gleichzeitig beschränkt es aber bereits *in utero* die funktionelle Kapazität des Herzens und erhöht die Wahrscheinlichkeit für zum Beispiel koronare Herzerkrankungen.<sup>170, 171</sup>

#### **7.4 Diskussion der Zellkulturversuche**

Im Tiermodell konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Angiotensin II im Vergleich zur WT Gruppe einen positiven Einfluss auf das Vorkommen von Trophoblasten im mesometrialen Dreieck der Ratte zeigte. Besonders in der PE+ Gruppe, in der Angiotensin II in der uteroplazentaren Einheit bereits ab Tag 9 erhöht war, wanderten die Trophoblasten aus der Labyrinthplazenta tief ins mesometriale Dreieck ein.

Invasive, extravillöse Trophoblasten gehen aus Zytotrophoblasten hervor, sobald diese den Kontakt zu ihrer Basalmembran verlieren.<sup>23</sup> Während des Differenzierungsprozesses zu invasiven Trophoblasten ist die Proliferationsrate vermindert, die Expression von Zelladhäsionsmoleküle verändert sich<sup>118</sup> und die Anfälligkeit gegenüber pro-apoptotischen Stimuli ist gesteigert.<sup>115</sup> Als Ursache für das vermehrte Vorkommen von Trophoblasten im mesometrialen Dreieck wären folgende Szenarien denkbar: (1) Es wandern mehr Trophoblasten aus der Plazenta aus. (2) Trophoblasten wandern in unveränderter Anzahl aus der Plazenta aus und proliferieren verstärkt oder (3) reagieren weniger stark auf pro-apoptotische Stimuli.

Der Einfluss von Angiotensin II auf Trophoblasten wurde unter Zuhilfenahme verschiedener Trophoblasten-Systeme untersucht: Die Isolation primärer Trophoblasten ist immer mit einer Änderung ihres Phänotypes *in vitro* verbunden. Auch der Einsatz von Zelllinien bietet sich nur begrenzt an, da diese nur einen Teil der Charakteristika extravillöser Trophoblasten *in vivo* repräsentieren.<sup>115</sup> Daher wurden die Zellkulturexperimente einerseits mit der gut charakterisierten und etablierten Trophoblastenzelllinie PL4 durchgeführt,<sup>113, 114</sup> andererseits auch an *explant*-Kulturen des ersten Trimesters, in denen dem Trophoblast seine physiologische Umgebung auch *in vitro* erhalten bleibt.<sup>109</sup>

Angiotensin II hatte keinen Einfluss auf Proliferation und Apoptose von Trophoblasten in *explant*-Kulturen. Erhöhte Proliferation oder verminderte Apoptose von Zytotrophoblasten an den Enden der Plazentazotten<sup>109</sup> scheint daher kein Angiotensin II-sensitiver Mechanismus zu sein, der eine große Zellmenge zur Differenzierung in invasive Trophoblasten zur Verfügung stellt. Eine lokale Proliferation von Zytotrophoblasten an der Anheftungsstelle der *explant*-Kultur ist eine weitere Möglichkeit, wie vermehrt Zellen für die Invasion bereitgestellt werden können.<sup>109</sup> Mikroskopische Aufnahmen von Migrationsexperimenten wiesen darauf hin, dass nach Angiotensin II Stimulation mehr extravillöse Trophoblasten pro Migrationsfläche vorhanden waren und diese sich weiter fortbewegten. Da keine erhöhte Proliferationsrate in den *explant*-Kulturen nachgewiesen werden konnte, müssen ausgewanderte Trophoblasten vermehrt proliferieren, um eine erhöhte Zellmenge für die Invasion zur Verfügung zu stellen. *Explant*-Kulturen der 7. Schwangerschaftswoche wurden hinsichtlich ihrer Caspase 3 Expression immunhistochemisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation über 6 Tage mit  $10^{-10}$  M,  $10^{-12}$  M und  $10^{-14}$  M Angiotensin II die Expression der

Caspase 3 dosisabhängig reduzierte.<sup>104</sup> Diese widersprüchlichen Ergebnisse können der Tatsache geschuldet sein, dass die Stimulation mit unterschiedlichen Dosen Angiotensin II über unterschiedlich lange Zeiträume erfolgte. Auch wurde die Caspase 3 evaluiert, nicht das aktive Spaltprodukt der Caspase 3.

Im Migrationsexperiment wurde die von extravillösen Trophoblasten bedeckte Zellfläche quantitativ ermittelt und es konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II die Migrationfläche extravillöser Trophoblasten auf kollagenbeschichtetem Untergrund vergrößerte. Extravillöse Trophoblasten wanderten nicht nur weiter aus, wie anhand der vergrößerten Migrationsfläche quantitativ ermittelt, sondern es wanderten unter Angiotensin II Stimulation auch mehr Trophoblasten aus, wie Aufnahmen der *explant*-Kulturen bewiesen. Diese Ergebnisse stimmen überein mit Untersuchungen von *explant*-Kulturen, die mit  $10^{-6}$  M Angiotensin II stimuliert wurden. Nach 24 Stunden Stimulation war das Auswandern extravillöser Trophoblasten leicht, nach 48 Stunden stark verstärkt. Der Einsatz des AT1-R Antagonisten Olmesartan reduzierte die Angiotensin II-verursachte Stimulation auf Kontrollniveau. Anders als in eigenen Experimenten wurde keine vermehrte Migration beobachtet, sondern gesteigerte Proliferation an den Enden der Plazentazotten der *explant*-Kultur, ebenso wie sich das Expressionsmuster der CAM gegensätzlich zur Differenzierung in extravillöse Trophoblasten entwickelte.<sup>132</sup> Ursächlich für die widersprüchlichen Ergebnisse können Unterschiede in der Versuchsdurchführung, wie verschiedene Stimulationsdauer und Stimulation in Voll- beziehungsweise Mangelmedium sein. Zudem ist das Alter der verwendeten *explant*-Kulturen nicht identisch, was von großer Bedeutung ist, da die Invasion extravillöser Trophoblasten mit ihrem Alter abnimmt.<sup>117</sup>

Im Gegensatz zur Migration erfordert die Invasion in eine dreidimensionale Matrix die Degradierung der extrazellulären Matrix.<sup>117</sup> Im Invasionsexperiment wurde die Anzahl ausgewanderter PL4 Zellen und die Länge der zurückgelegten Strecke im Fibrinigel bestimmt. Beide Parameter waren nach Stimulation mit Angiotensin II signifikant erhöht und durch Einsatz von Losartan blockbar. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde an BeWo Zellen eines Choriokarzinoms gezeigt, dass  $10^{-8}$  M Angiotensin II die Invasion im Matrigel *transwell*-Zellkulturversuch erhöhte.<sup>103</sup>  $10^{-7}$  M Angiotensin II hingegen inhibierten die Invasion von HTR-8/SVneo Zellen im Matrigel *transwell*-Zellkulturversuch, indem die Trophoblasten unter Angiotensin II Stimulation vermehrt *PAI1* synthetisierten und sezernierten. *PAI1* kontrolliert die Aktivität der

Plasminogenaktivatoren, die inaktives Plasminogen in Plasmin umwandeln, welches vor allem Fibrin spaltet, aber auch Kollagenasen aktiviert.<sup>77</sup>

Matrix-Metalloproteasen (MMP) und ihre gewebespezifischen Inhibitoren (*TIMP*) spielen eine wichtige Rolle während der Invasion von Trophoblasten, indem sie Basalmembranen und Bestandteile der extrazellulären Matrix degradieren. So wurde die Expression verschiedener MMP in Plazenta und Trophoblasten nachgewiesen, während von invasiven Trophoblasten und Zellen der Dezidua exprimiert vor allem *TIMP* 3 wird.<sup>118</sup> Im Fibrin-Invasionsexperiment konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass der MMP Inhibitor Doxycyclin die Invasion von PL4 Zellen reduzierte. Auch eine systemische Verabreichung von Doxycyclin verminderte die Trophoblasteninvasion in das mesometrialen Dreieck der PE+ Gruppe signifikant.<sup>172</sup> An kultivierten Endothelzellen konnte nachgewiesen werden, dass Angiotensin II die Freisetzung von MMP 2 erhöht.<sup>173</sup> Die Infusion von Angiotensin II erhöhte Expression und Aktivierung von MMP 2 in der Halsschlagader der Ratte und führte zu verstärktem, hypertrophiertem Umbau des Gefäßes, nachgewiesen durch Zunahme des Gefäßdurchmessers. In Zellkulturexperimenten konnte die MMP 2 abhängige Invasion von glatten Gefäßmuskelzellen in mit Matrigel beschichteten Boyden-Kammern durch Angiotensin II vermehrt werden.<sup>174</sup> Daher könnte eine Angiotensin II-verursachte Überexpression von MMP 2 zum vermehrten, tiefen Vorkommen von Trophoblasten im mesometrialen Dreieck der PE+ Gruppe beitragen.

Aufgrund des erhöhten Umsatzes von Trophoblasten kommt es bei Präeklampsie zur Freisetzung nekrotischer Synzytiotrophoblasten, die die Apoptosekaskade nur teilweise durchlaufen haben. Apoptose extravillöser Trophoblasten tritt bei Präeklampsie und *IUGR* vermehrt auf.<sup>115</sup> Biopsien humaner Deziduas aus Kontrollschwangerschaften und Schwangerschaften mit Präeklampsie wurden hinsichtlich apoptotischer Trophoblasten untersucht. In den Kontrollen wurde sehr wenig Apoptose nachgewiesen, während 15% bis 50% aller Trophoblasten in der Dezidua bei Präeklampsie positiv für Apoptose waren.<sup>175</sup> Entgegen diesen Resultaten wurde im Endometrium, das nach Kaiserschnittentbindung und Hysterektomie gewonnen wurde, bei Präeklampsie weniger extravillöse Trophoblasten mit Apoptose beobachtet.<sup>176</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Angiotensin II im *in vitro* Apoptoseassay keinen Einfluss auf die induzierte Apoptose von extravillösen PL4 Zellen ausübte. PL4 Zellen entstammen primären, extravillösen Trophoblasten und sind als solche nicht in der Lage, ein Synzytium

bilden. Daher konnte eine Aponekrose, wie sie am Synzytiotrophoblasten auftritt, nicht untersucht werden. Verminderte Apoptose extravillöser Trophoblasten war nicht der Mechanismus, der Angiotensin II-abhängig zum vermehrten Vorkommen von Trophoblasten im mesometrialen Dreieck in entsprechenden Versuchstiergruppen führte.

Anhand der erhobenen *in vitro* Daten erfolgte die Proliferation von Trophoblasten, die eine große Anzahl von Zellen für die Invasion zur Verfügung stellt, außerhalb der *explant*-Kulturen, während Apoptose in der *explant*-Kultur oder von extravillösen Trophoblasten keine Rolle spielte. Weiterhin reagierten extravillöse Trophoblasten mit vermehrtem und weiterem Auswandern aus *explant*-Kulturen auf Stimulation mit Angiotensin II. Dies konnte im Invasionsexperiment mit PL4 Zellen bestätigt werden.

## 7.5 Medizinische Relevanz

Pathologische Prozesse im ersten Trimester führen zur sichtbaren Manifestation der Präeklampsie im dritten Trimester. Daher werden Biomarker gesucht, die die frühzeitige Erkennung einer Präeklampsie erlauben. Zur Verfügung stehen ein angiogenetischer Index, der den *placental growth factor (PLGF)*, lösliches Endoglin sowie *sFLT-1* im Plasma bestimmt und die Messung des Widerstandsindex der uterinen Arterien.<sup>21</sup>

Eine effektive, primäre Prävention der Präeklampsie gestaltete sich in vielen Studien schwierig, da die Pathogenese vor Manifestation der Symptome erfolgt und noch immer nicht vollständig aufgeklärt ist. So wurden Diuretika zur Behandlung der Salzretention verabreicht, die allerdings die Reduktion des Plasmavolumens bei Präeklampsie noch verstärkten und somit das Renin-Angiotensin-System stimulierten. Supplementation mit Kalzium aufgrund von Kalziummangel, gesteigerter Sensivität gegenüber Angiotensin II und Vitamin D Mangel während einer Präeklampsie verminderte nicht das Risiko für Präeklampsie, reduzierte aber die damit in Verbindung stehenden Komplikationen. Aufgrund von Gefäßkrämpfen und Thrombosen bei Präeklampsie wurde der Einfluss geringer Dosen Aspirin getestet, wobei die Ergebnisse mehrerer Studien widersprüchlich sind. Aspirin in Kombination mit niedrigmolekularem Heparin hingegen verlängerte die Schwangerschaftszeit signifikant, erhöhte das Geburtsgewicht und verminderte die Wahrscheinlichkeit für Präeklampsie bei einer zweiten Schwangerschaft. Auch der Einsatz von Vitamin C und E zur Reduktion des oxidativen Stresses zeigte keinen Erfolg.<sup>21</sup>

Die zuverlässigste Behandlung einer manifestierten Präeklampsie ist die Entbindung, wobei die Risiken für das Kind gegen die Risiken der Mutter genau abgewogen werden müssen. Der optimale Blutdruck während einer Schwangerschaft mit Präeklampsie ist unbekannt.<sup>21</sup> So sind Blutdruckabfall der Mutter und niedriges Geburtsgewicht des Föten positiv korreliert.<sup>57</sup> Daher ist das Ziel, die Schwangerschaft zu verlängern, ohne dass die Mutter durch Bluthochdruck und Endorganschäden zu stark geschädigt wird. Magnesiumsulfat wird erfolgreich eingesetzt, um Krämpfe bei Eklampsie zu vermeiden, während Antiepileptika nicht so erfolgreich waren. Medikamentös behandelt werden systolische Blutdruckwerte über 160 mmHg, weniger stark ausgeprägter Bluthochdruck wird nicht behandelt. ACE Hemmer, AT1-R Antagonisten und Kalziumantagonisten schaden dem Föten.<sup>177</sup>

Bei Präeklampsie wird eine verminderte Invasion von Trophoblasten beobachtet. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass lokal synthetisiertes Angiotensin II die Invasion von Trophoblasten im Tiermodell förderte. Dies konnte in Zellkulturversuchen bestätigt werden, indem Angiotensin II Migration und Invasion in verschiedenen experimentellen Ansätzen förderte. Bisher sind nur wenige Faktoren bekannt, die die Invasion von Trophoblasten stimulieren. So wurde im Matrigel *transwell*-Invasionsexperiment gezeigt, dass *EGF* und auch Interleukin 1 $\beta$  die Invasion primärer Zytotrophoblasten förderte.<sup>178, 179</sup> Faktoren, die positiv auf die Invasion von Trophoblasten einwirken, sollten hinsichtlich ihres Mechanismus weiter untersucht werden. Dazu können Experimente zur MMP/*TIMP* Expression und Aktivierung, zur Änderung des CAM Expressionsmusters und weiterer Faktoren, die in die Invasion von Trophoblasten involviert sind, beitragen. Weiterhin könnte Angiotensin II *in vivo* in der uteroplazentaren Einheit überexprimiert werden, zum Beispiel durch Einsatz von Transposons<sup>180</sup> oder trophoblastenspezifischer Promotoren.<sup>181, 182</sup> Die Injektion von Angiotensin II in die uteroplazentare Einheit wäre eher schwierig zu bewerkstelligen, da sie regelmäßig wiederholt werden müsste. Zudem sollte eine Injektion unter Ultraschallkontrolle erfolgen, wofür die Tiere regelmäßig narkotisiert werden müssten. Das Standardmittel bei Narkotisierung ist die Isofluran-Inhalationsnarkose, die reproduktionstoxische Effekte auslöst. (Sicherheitsdatenblatt Isofluran, Abbott)

Die Nachkommen der Versuchstiere, besonders der PE+ Gruppe, waren bereits direkt nach Geburt durch asymmetrisches Wachstum und pathologische Veränderungen am Herz gekennzeichnet. Das Risiko für kardiovaskuläre

Erkrankungen<sup>2</sup> und Schlaganfall<sup>164</sup> ist bei Nachkommen aus humanen Schwangerschaften mit Präeklampsie erhöht. Durch die Übereinstimmungen zwischen Tiermodell und menschlicher Situation ergibt sich die Möglichkeit, zugrunde liegende Mechanismen im Tiermodell zu untersuchen und präventive Substanzen auszutesten. Bei Ratten mit einer geringeren Lebenserwartung manifestieren sich kardiovaskuläre Erkrankungen deutlich eher als im Menschen. Regelmäßige Untersuchungen der Menschen über einen lebenslangen Zeitraum hinweg gestalten sich zum Beispiel aufgrund von Umzügen, fehlender Kooperationsbereitschaft schwierig.

Aufgrund der positiven Korrelation zwischen Präeklampsie und kardiovaskulären Erkrankungen von Mutter und Kind<sup>2, 164, 183</sup> ergibt sich die Notwendigkeit regelmäßiger Vorsorgeuntersuchungen und adäquater Beratung zur Reduktion weiterer Risikofaktoren. Eine Umfrage im Bostoner Krankenhaus hat ergeben, dass 56% der Internisten nicht um die Assoziation zwischen Präeklampsie und ischämischen Herzerkrankungen wussten. Lediglich 9% der Internisten informierten Frauen, die vormals an Präeklampsie erkrankt waren, über Maßnahmen zur Verminderung der Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen.<sup>184</sup>

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die in der Barker Hypothese vermutete *in utero* Unterentwicklung der Herzen<sup>170</sup> sich bereits direkt nach der Geburt in einem verminderten Herzgewicht und vermehrter Expression von Herzhypertrophie markern manifestiert hatte. Somit sollten auch die Nachkommen präeklampsischer Schwangerschaften von Geburt an regelmäßig untersucht und adäquat beraten werden.

## 7.6 Ausblick

Studien zum Krankheitsbild Präeklampsie und am Rattenmodell für Präeklampsie sind seit einiger Zeit ein wichtiges Forschungsgebiet in unserer Arbeitsgruppe. In Zusammenarbeit mit Prof. R. Pijnenborg und Dr. N. Geusens konnten wir ein umfassendes Bild über den zeitlichen Verlauf einer physiologischen Rattenschwangerschaft gewinnen, wobei die uteroplazentare Einheit von besonderem Interesse war. Die hämodynamischen und kardiovaskulären Verhältnisse während der Schwangerschaft der Ratte sind in einigen Punkten mit der menschlichen Situation vergleichbar. Neben sportlicher Betätigung und dem Reifungsprozess führt allein die Schwangerschaft zu einer physiologischen

Herzhypertrophie.<sup>38</sup> Dieser Punkt soll in zukünftigen Studien genauer untersucht werden, vor allem in Hinblick auf die nicht-physiologische Herzhypertrophie bei Präeklampsie<sup>38</sup> und die Regression der Herzhypertrophie, die bei Präeklampsie verschlechtert ist<sup>44</sup> und zu einer erhöhten Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen im späteren Leben der Mutter führt.<sup>2</sup> Dabei soll auch das nicht-invasive Bildgebungsverfahren der Ultrahochfeld-Magnetresonanztomographie zum Einsatz kommen.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Trophoblasteninvasion in der PE+ Gruppe nicht der humanen Situation entspricht. Die relevanteren Kennzeichen, wie der *remodeling*-Prozess und die Wachstumsbeeinträchtigung *in utero*, entsprachen hingegen der Situation bei humaner Präeklampsie. Im Gegensatz zur Maus scheint sowohl die Ratte im Allgemeinen<sup>85</sup> als auch unser spezielles Rattenmodell für Präeklampsie gut geeignet zu sein, um die Vorgänge in der uteroplazentaren Einheit als auch ihre Auswirkungen auf den Föten genauer zu untersuchen. So soll der bisher völlig unbekannte molekulare Mechanismus, wie eingewanderte Trophoblasten mit Gefäßmuskelzellen der Spiralarterien interagieren, *in vivo* durch trophoblastenspezifische Überexpression mithilfe des *sleeping beauty transposon system*<sup>180</sup> untersucht werden. Als mögliches Gen kommt dabei der AT1 Rezeptor in Frage, dessen Überexpression in der humanen Dezidua in die Entstehung einer Präeklampsie involviert ist.<sup>72</sup>

In einem weiteren interventionellen Versuchsansatz sollen Therapieregime untersucht werden, die während der Schwangerschaft verabreicht werden, um den mütterlichen Phänotyp, den *remodeling*-Prozess und die *in utero* Wachstumsbeeinträchtigung zu beeinflussen: Dazu gehören Substanzen wie Statine<sup>185</sup> und omega-3-Fettsäuren,<sup>186</sup> die die endotheliale Dysfunktion, die zur Entstehung von Präeklampsie beiträgt,<sup>187</sup> verbessern. Ein weiterer lohnenswerter Ansatz ist die Gabe des CD 28 *superagonist*, welcher regulatorische T-Zellen aktiviert.<sup>188</sup> Bei Autoimmunkrankheiten wie Arthritis<sup>188</sup> oder auch bei Angiotensin II-induziertem Herzschaden<sup>189</sup> führte die Aktivierung regulatorischer T-Zellen zur Abnahme der Effektor-T-Zellen, sodass die systemische Immunantwort abgeschwächt und die Symptome der jeweiligen Krankheit verbessert wurden. Bei Präeklampsie konnte die während der normalen Schwangerschaft beobachtete Zunahme regulatorischer T-Zellen nicht nachgewiesen werden.<sup>190</sup> Die Anwendung von Substanzen, die zur



Aktivierung regulatorischer T-Zellen führen, könnten die Plazentation, die eine Toleranz von auf Trophoblasten präsentierten väterlichen Antigenen durch mütterliche Immunzellen erfordert, positiv beeinflussen.<sup>191</sup>

## **8 Zusammenfassung**

Die schwangerschaftsspezifische Erkrankung Präeklampsie hat negative Auswirkungen auf die Gesundheit von Mutter und Nachwuchs. Trotz intensiver Forschung sind die Ursachen, die zur Entstehung einer Präeklampsie führen, nicht vollständig bekannt. Sowohl das zirkulierende als auch das lokale, uteroplazentare Renin-Angiotensin-System ist in die Entstehung und Entwicklung einer Präeklampsie involviert, jedoch ist unklar, welche Bedeutung das zirkulierende und welche Bedeutung das uteroplazentare Renin-Angiotensin-System hat. Diese Arbeit sollte sowohl das zirkulierende als auch das lokale uteroplazentare Renin-Angiotensin-System während einer physiologischen Schwangerschaft und einer Schwangerschaft mit Präeklampsie im Rattenmodell beschreiben sowie deren Einfluss anhand der Charakterisierung von Mutter und Fötus aufzeigen.

Im Gegensatz zu vielfach publizierten Dosierungen von Angiotensin II außerhalb der Schwangerschaft, mussten 1000 ng/kg/min Angiotensin II als die Dosis ermittelt werden, die durch chronisch, systemische Infusion zu einer stabilen Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks sowie zum Anstieg der Angiotensin II Plasmaspiegel in schwangeren Ratten führte. Diese durch erhöhte zirkulierende Angiotensin II Spiegel gekennzeichneten Tiere wurden der ANGII ++ Gruppe zugeordnet. Die PE-Gruppe, in der für humanes Renin transgene Weibchen mit für humanes Angiotensinogen transgenen Männchen verpaart waren, war durch ausschließlich uteroplazentar erhöhte Angiotensin II Werte gekennzeichnet. In der PE+ Gruppe, in der humanes Angiotensinogen überexprimierende Weibchen mit humanem Renin überexprimierenden Männchen verpaart waren, konnten sowohl uteroplazentar als auch zirkulär erhöhte Angiotensin II Werte nachgewiesen werden.

Die Hauptsymptome für die klinische Diagnose einer Präeklampsie, Bluthochdruck und Albuminurie, waren alleinig in beiden Tiermodellen mit erhöhtem zirkulierendem Angiotensin II nachweisbar. Die Niere der Versuchstiere der PE+ Gruppe war darüber hinausgehend geschädigt, wie durch nachgewiesene Anzeichen einer Endotheliose, die eine kennzeichnende Veränderung bei humaner Präeklampsie ist, und erhöhte Expression von *NGAL* gezeigt.

Ein weiterer Abschnitt der Arbeit beschäftigt sich mit den Auswirkungen von Schwangerschaft und Präeklampsie auf das mütterliche Herz: Es konnte gezeigt

werden, dass in der WT Gruppe unter dem Einfluss der Schwangerschaft Aspekte einer physiologischen Herzhypertrophie, wie Abnahme der Expression untersuchter Hypertrophie- und Fibrosemarker, gefunden wurden. Demgegenüber traten in der PE+ Gruppe Zeichen einer pathologischen Herzhypertrophie auf, wie durch Zunahme der Expression von ANP und untersuchter Fibrosemarker gezeigt werden konnte. Auch in der PE- und der ANGII ++ Gruppe war die physiologische Herzhypertrophie während der Schwangerschaft aufgehoben, wie durch im Vergleich zur WT Gruppe erhöhte Expression von ANP nachgewiesen.

Auch die Trophoblasteninvasion wurde durch zirkulierendes und uteroplazentares Angiotensin II unterschiedlich beeinflusst: So unterstützte lokales, uteroplazentares Angiotensin II die tiefe Invasion von Trophoblasten in plazentafernen Spiralarterien, während zirkulierendes Angiotensin II die Trophoblasteninvasion im gesamten mesometrialen Dreieck eher diffus förderte. Der anhand der Persistenz von glatten Gefäßmuskelzellen untersuchte *remodeling*-Prozess war besonders in den Modellen mit hohen zirkulierenden Angiotensin II Spiegel reduziert und nur leicht in der PE-Gruppe.

Der symmetrische Kleinwuchs der Föten der PE- Gruppe war durch den leicht reduzierten Umbau der Spiralarterien verursacht, der aber nicht ausreichte, um assymmetrischen Kleinwuchs zu bewirken. Ein assymmetrischer Kleinwuchs wurde an den Nachkommen der PE+ und der ANGII ++ Gruppe nachgewiesen, wobei die dem für den Kleinwuchs verantwortlichen defekten *remodeling*-Prozess zugrunde liegenden Mechanismen unterschiedlicher Natur sind. Obwohl das Hirn und das Herz bei Mangelversorgung des Föten bevorzugt versorgt werden, kam es in allen Versuchsgruppe im Vergleich zur WT Gruppe zu einer Abnahme des Herz- und Hirngewichtes, der in der ANGII ++ Gruppe besonders stark ausgeprägt war. Die Nachkommen der PE- und der PE+ Gruppe, die beide sowohl humanes Renin als auch humanes Angiotensinogen exprimierten, zeigten gesteigerte Expressionen für *ANP* und *BNP* im Herz.

In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass lokales Angiotensin II die Mobilität wie auch die Invasion einer extravillösen Trophoblastenzelllinie förderte. Ebenso erhöhte Angiotensin II die Migration extravillöser Trophoblasten in *explant*-Kulturen des ersten Schwangerschaftsdrittels. Keinen Einfluss hatte Angiotensin II hingegen auf die Apoptose und Proliferation von Trophoblasten.

Diese Ergebnisse verdeutlichen den unterschiedlichen Einfluss zirkulierender und lokaler Renin-Angiotensin-Systeme auf die Schwangerschaft und tragen damit zum besseren Verständnis pathologischer Prozesse bei, die zu Präeklampsie führen. In Übereinstimmung mit den erhobenen *in vitro* Daten unterstützte lokales uteroplazentares Angiotensin II die Invasionstiefe fötaler Zellen im mütterlichen Teil der uteroplazentaren Einheit und unterschied sich darin in der Wirkung von zirkulierendem Angiotensin II. Zudem konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Modelle sehr gut zur Charakterisierung der physiologischen Herzhypertrophie während der Schwangerschaft und der Schwangerschaft unter hypertensiven Bedingungen geeignet sind.

## 9 Literaturverzeichnis

1. Stevens JM. Gynaecology from ancient Egypt: The papyrus Kahun: A translation of the oldest treatise on gynaecology that has survived from the ancient world. *Med J Aust.* 1975;2:949-952.
2. Carty DM, Delles C, Dominiczak AF. Preeclampsia and future maternal health. *J Hypertens.* 28:1349-1355.
3. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol.* 2002;99:159-167.
4. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2005;365:785-799.
5. Norwitz ER, Repke JT. Preeclampsia prevention and management. *J Soc Gynecol Investig.* 2000;7:21-36.
6. Roberts JM, Pearson GD, Cutler JA, Lindheimer MD. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertens Pregnancy.* 2003;22:109-127.
7. Ness RB, Roberts JM. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: a hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;175:1365-1370.
8. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 2005;308:1592-1594.
9. Trupin LS, Simon LP, Eskenazi B. Change in paternity: a risk factor for preeclampsia in multiparas. *Epidemiology.* 1996;7:240-244.
10. Einarsson JI, Sangi-Haghpeykar H, Gardner MO. Sperm exposure and development of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:1241-1243.
11. James JL, Whitley GS, Cartwright JE. Pre-eclampsia: fitting together the placental, immune and cardiovascular pieces. *J Pathol.* 221:363-378.
12. Chesley LC. Hypertension in pregnancy: definitions, familial factor, and remote prognosis. *Kidney Int.* 1980;18:234-240.
13. Heydanus R, Defoort P, Dhont M. Pre-eclampsia and trisomy 13. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1995;60:201-202.
14. Bdolah Y, Palomaki GE, Yaron Y, Bdolah-Abram T, Goldman M, Levine RJ, Sachs BP, Haddow JE, Karumanchi SA. Circulating angiogenic proteins in trisomy 13. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194:239-245.
15. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003;111:649-658.
16. Roberts JM, Gammill HS. Preeclampsia: recent insights. *Hypertension.* 2005;46:1243-1249.
17. Roberts JM, Hubel CA. Is oxidative stress the link in the two-stage model of pre-eclampsia? *Lancet.* 1999;354:788-789.
18. Dechend R, Gratze P, Wallukat G, Shagdasuren E, Plehm R, Brasen JH, Fiebeler A, Schneider W, Caluwaerts S, Vercruysse L, Pijnenborg R, Luft FC, Muller DN. Agonistic autoantibodies to the AT1 receptor in a transgenic rat model of preeclampsia. *Hypertension.* 2005;45:742-746.
19. Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and pre-eclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006;11:309-316.
20. Shah DM. Preeclampsia: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007;16:213-220.

21. Jim B, Sharma S, Kebede T, Acharya A. Hypertension in pregnancy: a comprehensive update. *Cardiol Rev.* 18:178-189.
22. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet.* 2001;357:53-56.
23. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol.* 2008;61:1296-1302.
24. Huppertz B. Placental origins of preeclampsia: challenging the current hypothesis. *Hypertension.* 2008;51:970-975.
25. Brosens I, Robertson WB, Dixon HG. The physiological response of the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J Pathol Bacteriol.* 1967;93:569-579.
26. Vercruysse L, Caluwaerts S, Luyten C, Pijnenborg R. Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. *Placenta.* 2006;27:22-33.
27. Caluwaerts S, Vercruysse L, Luyten C, Pijnenborg R. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta.* 2005;26:574-584.
28. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu.* 1972;1:177-191.
29. Pijnenborg R, Vercruysse L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta.* 2006;27:939-958.
30. Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187:1416-1423.
31. Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M. Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta.* 2000;21 Suppl A:S25-30.
32. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod.* 2003;69:1-7.
33. Geusens N, Verlohren S, Luyten C, Taube M, Hering L, Vercruysse L, Hanssens M, Dudenhausen JW, Dechend R, Pijnenborg R. Endovascular trophoblast invasion, spiral artery remodelling and uteroplacental haemodynamics in a transgenic rat model of pre-eclampsia. *Placenta.* 2008;29:614-623.
34. VanWijk MJ, Kublickiene K, Boer K, VanBavel E. Vascular function in preeclampsia. *Cardiovasc Res.* 2000;47:38-48.
35. Andrietti S, Kruse AJ, Bekkers SC, Sep S, Spaanderman M, Peeters LL. Cardiac adaptation to pregnancy in women with a history of preeclampsia and a subnormal plasma volume. *Reprod Sci.* 2008;15:1059-1065.
36. Visser W, Wallenburg HC. Central hemodynamic observations in untreated preeclamptic patients. *Hypertension.* 1991;17:1072-1077.
37. Eghbali M, Wang Y, Toro L, Stefani E. Heart hypertrophy during pregnancy: a better functioning heart? *Trends Cardiovasc Med.* 2006;16:285-291.
38. Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y, Toro L, Stefani E. Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. *Circ Res.* 2005;96:1208-1216.
39. Jankowski M, Wang D, Mukaddam-Daher S, Gutkowska J. Pregnancy alters nitric oxide synthase and natriuretic peptide systems in the rat left ventricle. *J Endocrinol.* 2005;184:209-217.

40. Farhadian F, Contard F, Corbier A, Barrieux A, Rappaport L, Samuel JL. Fibronectin expression during physiological and pathological cardiac growth. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:981-990.
41. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation.* 1991;83:1849-1865.
42. Miner EC, Miller WL. A look between the cardiomyocytes: the extracellular matrix in heart failure. *Mayo Clin Proc.* 2006;81:71-76.
43. Oh SY, Song SE, Seo ES, Kim KH, Choi SJ, Suh YL, Sadovsky Y, Roh CR. The expression of connective tissue growth factor in pregnancies complicated by severe preeclampsia or fetal growth restriction. *Placenta.* 2009;30:981-987.
44. Simmons LA, Gillin AG, Jeremy RW. Structural and functional changes in left ventricle during normotensive and preeclamptic pregnancy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H1627-1633.
45. Smith GC, Pell JP, Walsh D. Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129,290 births. *Lancet.* 2001;357:2002-2006.
46. Mirza FG, Cleary KL. Pre-eclampsia and the kidney. *Semin Perinatol.* 2009;33:173-178.
47. Karumanchi SA, Maynard SE, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP. Preeclampsia: a renal perspective. *Kidney Int.* 2005;67:2101-2113.
48. D'Anna R, Baviera G, Giordano D, Todarello G, Russo S, Recupero S, Bolignano D, Corrado F. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin serum evaluation through normal pregnancy and in pregnancies complicated by preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 89:275-278.
49. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, Barasch J. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:407-413.
50. Devarajan P. Review: neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology (Carlton).* 15:419-428.
51. McDonald SD, Han Z, Walsh MW, Gerstein HC, Devereaux PJ. Kidney disease after preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 55:1026-1039.
52. Davison JM, Homuth V, Jeyabalan A, Conrad KP, Karumanchi SA, Quaggin S, Dechend R, Luft FC. New aspects in the pathophysiology of preeclampsia. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2440-2448.
53. Breeze AC, Lees CC. Prediction and perinatal outcomes of fetal growth restriction. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2007;12:383-397.
54. Wollmann HA. Intrauterine growth restriction: definition and etiology. *Horm Res.* 1998;49 Suppl 2:1-6.
55. Barker DJ, Osmond C, Kajantie E, Eriksson JG. Growth and chronic disease: findings in the Helsinki Birth Cohort. *Ann Hum Biol.* 2009;36:445-458.
56. Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195:40-49.
57. von Dadelszen P, Ornstein MP, Bull SB, Logan AG, Koren G, Magee LA. Fall in mean arterial pressure and fetal growth restriction in pregnancy hypertension: a meta-analysis. *Lancet.* 2000;355:87-92.
58. Melchiorre K, Leslie K, Prefumo F, Bhide A, Thilaganathan B. First-trimester uterine artery Doppler indices in the prediction of small-for-gestational age

- pregnancy and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;33:524-529.
59. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev.* 2003;24:261-271.
60. Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA. Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H2281-2290.
61. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2000;275:33238-33243.
62. Warner FJ, Smith AI, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme-2: a molecular and cellular perspective. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:2704-2713.
63. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J, Godbout K, Parsons T, Baronas E, Hsieh F, Acton S, Patane M, Nichols A, Tummino P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 2002;277:14838-14843.
64. Johar S, Cave AC, Narayanapanicker A, Grieve DJ, Shah AM. Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase. *Faseb J.* 2006;20:1546-1548.
65. Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM, Speth RC, Raizada MK, Katovich MJ. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H736-742.
66. Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension.* 2001;38:665-668.
67. Shah DM. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288:F614-625.
68. Herse F, Staff AC, Hering L, Muller DN, Luft FC, Dechend R. AT1-receptor autoantibodies and uteroplacental RAS in pregnancy and pre-eclampsia. *J Mol Med.* 2008;86:697-703.
69. Abdul-Karim R, Assalin S. Pressor response to angiotonin in pregnant and nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1961;82:246-251.
70. Gant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. *J Clin Invest.* 1973;52:2682-2689.
71. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest.* 1999;103:945-952.
72. Herse F, Dechend R, Harsem NK, Wallukat G, Janke J, Qadri F, Hering L, Muller DN, Luft FC, Staff AC. Dysregulation of the circulating and tissue-based renin-angiotensin system in preeclampsia. *Hypertension.* 2007;49:604-611.
73. Wang Y, Gu Y, Zhang Y, Lewis DF, Alexander JS, Granger DN. Increased chymotrypsin-like protease (chymase) expression and activity in placentas from women with preeclampsia. *Placenta.* 2007;28:263-269.
74. Valdes G, Neves LA, Anton L, Corthorn J, Chacon C, Germain AM, Merrill DC, Ferrario CM, Sarao R, Penninger J, Brosnihan KB. Distribution of angiotensin-



- (1-7) and ACE2 in human placentas of normal and pathological pregnancies. *Placenta*. 2006;27:200-207.
75. Anton L, Merrill DC, Neves LA, Stovall K, Gallagher PE, Diz DI, Moorefield C, Gruver C, Ferrario CM, Brosnihan KB. Activation of local chorionic villi angiotensin II levels but not angiotensin (1-7) in preeclampsia. *Hypertension*. 2008;51:1066-1072.
76. Takimoto-Ohnishi E, Saito T, Ishida J, Ohnishi J, Sugiyama F, Yagami K, Fukamizu A. Differential roles of renin and angiotensinogen in the fetomaternal interface in the development of complications of pregnancy. *Mol Endocrinol*. 2005;19:1361-1372.
77. Xia Y, Wen HY, Kellems RE. Angiotensin II inhibits human trophoblast invasion through AT1 receptor activation. *J Biol Chem*. 2002;277:24601-24608.
78. Irani RA, Xia Y. The functional role of the renin-angiotensin system in pregnancy and preeclampsia. *Placenta*. 2008;29:763-771.
79. Brosnihan KB, Neves LA, Anton L, Joyner J, Valdes G, Merrill DC. Enhanced expression of Ang-(1-7) during pregnancy. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37:1255-1262.
80. LaMarca B, Wallukat G, Llinas M, Herse F, Dechend R, Granger JP. Autoantibodies to the angiotensin type I receptor in response to placental ischemia and tumor necrosis factor alpha in pregnant rats. *Hypertension*. 2008;52:1168-1172.
81. Iwai N, Inagami T. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett*. 1992;298:257-260.
82. Iwai N, Inagami T, Ohmichi N, Nakamura Y, Saeki Y, Kinoshita M. Differential regulation of rat AT1a and AT1b receptor mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;188:298-303.
83. Saito T, Ishida J, Takimoto-Ohnishi E, Takamine S, Shimizu T, Sugaya T, Kato H, Matsuoka T, Nangaku M, Kon Y, Sugiyama F, Yagami K, Fukamizu A. An essential role for angiotensin II type 1a receptor in pregnancy-associated hypertension with intrauterine growth retardation. *Faseb J*. 2004;18:388-390.
84. Carter AM, Pijnenborg R. Evolution of invasive placentation with special reference to non-human primates. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*.
85. Carter AM, Enders AC, Jones CJP, Mess A, Pfarrer C, Pijnenborg R, Soma H. Comparative placentation and animal models: Patterns of trophoblast invasion - A workshop report. *Placenta*. 2006;27:S30-S33.
86. Stout C, Lemmon WB. Glomerular capillary endothelial swelling in a pregnant chimpanzee. *Am J Obstet Gynecol*. 1969;105:212-215.
87. Van Wagenen G. Vital statistics from a breeding colony. Reproduction and pregnancy outcome in *Macaca mulatta*. *J Med Primatol*. 1972;1:2-28.
88. Thornton JG, Onwude JL. Convulsions in pregnancy in related gorillas. *Am J Obstet Gynecol*. 1992;167:240-241.
89. Sunderland N, Hennessy A, Makris A. Animal models of pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*.
90. Granger JP, LaMarca BB, Cockrell K, Sedeek M, Balzi C, Chandler D, Bennett W. Reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model for studying cardiovascular-renal dysfunction in response to placental ischemia. *Methods Mol Med*. 2006;122:383-392.
91. LaMarca BD, Alexander BT, Gilbert JS, Ryan MJ, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension in response to placental

- ischemia during pregnancy: a central role for endothelin? *Gend Med*. 2008;5 Suppl A:S133-138.
92. LaMarca BB, Bennett WA, Alexander BT, Cockrell K, Granger JP. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Hypertension*. 2005;46:1022-1025.
93. LaMarca B, Parrish M, Ray LF, Murphy SR, Roberts L, Glover P, Wallukat G, Wenzel K, Cockrell K, Martin JN, Jr., Ryan MJ, Dechend R. Hypertension in response to autoantibodies to the angiotensin II type I receptor (AT1-AA) in pregnant rats: role of endothelin-1. *Hypertension*. 2009;54:905-909.
94. Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, Hicks MJ, Ramin SM, Kellems RE, Xia Y. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat Med*. 2008;14:855-862.
95. Ganten D, Wagner J, Zeh K, Bader M, Michel JB, Paul M, Zimmermann F, Ruf P, Hilgenfeldt U, Ganten U, et al. Species specificity of renin kinetics in transgenic rats harboring the human renin and angiotensinogen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:7806-7810.
96. Takimoto E, Ishida J, Sugiyama F, Horiguchi H, Murakami K, Fukamizu A. Hypertension induced in pregnant mice by placental renin and maternal angiotensinogen. *Science*. 1996;274:995-998.
97. Bohlender J, Ganten D, Luft FC. Rats transgenic for human renin and human angiotensinogen as a model for gestational hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11:2056-2061.
98. Brosnihan KB, Hering L, Dechend R, Chappell MC, Herse F. Increased angiotensin II in the mesometrial triangle of a transgenic rat model of preeclampsia. *Hypertension*. 55:562-566.
99. Verlohren S, Niehoff M, Hering L, Geusens N, Herse F, Tintu AN, Plagemann A, LeNoble F, Pijnenborg R, Muller DN, Luft FC, Dudenhausen JW, Gollasch M, Dechend R. Uterine vascular function in a transgenic preeclampsia rat model. *Hypertension*. 2008;51:547-553.
100. Falcao S, Stoyanova E, Cloutier G, Maurice RL, Gutkowska J, Lavoie JL. Mice overexpressing both human angiotensinogen and human renin as a model of superimposed preeclampsia on chronic hypertension. *Hypertension*. 2009;54:1401-1407.
101. Redline RW, Patterson P. Pre-eclampsia is associated with an excess of proliferative immature intermediate trophoblast. *Hum Pathol*. 1995;26:594-600.
102. Ino K, Uehara C, Kikkawa F, Kajiyama H, Shibata K, Suzuki T, Khin EE, Ito M, Takeuchi M, Itakura A, Mizutani S. Enhancement of aminopeptidase A expression during angiotensin II-induced choriocarcinoma cell proliferation through AT1 receptor involving protein kinase C- and mitogen-activated protein kinase-dependent signaling pathway. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:3973-3982.
103. Ishimatsu S, Itakura A, Okada M, Kotani T, Iwase A, Kajiyama H, Ino K, Kikkawa F. Angiotensin II augmented migration and invasion of choriocarcinoma cells involves PI3K activation through the AT1 receptor. *Placenta*. 2006;27:587-591.
104. Williams PJ, Mistry HD, Innes BA, Bulmer JN, Pipkin FB. Expression of AT1R, AT2R and AT4R and their roles in extravillous trophoblast invasion in the human. *Placenta*. 31:448-455.
105. Kalenga MK, De Gasparo M, Thomas K, De Hertogh R. Angiotensin-II stimulates estradiol secretion from human placental explants through AT1 receptor activation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:1233-1237.

106. Kalenga MK, de Gasparo M, Thomas K, De Hertogh R. Angiotensin II induces human placental lactogen and pregnancy-specific beta 1-glycoprotein secretion via an angiotensin AT1 receptor. *Eur J Pharmacol.* 1994;268:231-236.
107. Lyall F. Priming and remodelling of human placental bed spiral arteries during pregnancy--a review. *Placenta.* 2005;26 Suppl A:S31-36.
108. Newby D, Marks L, Cousins F, Duffie E, Lyall F. Villous explant culture: characterization and evaluation of a model to study trophoblast invasion. *Hypertens Pregnancy.* 2005;24:75-91.
109. Miller RK, Genbacev O, Turner MA, Aplin JD, Caniggia I, Huppertz B. Human placental explants in culture: approaches and assessments. *Placenta.* 2005;26:439-448.
110. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF, 3rd. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology.* 1986;118:1567-1582.
111. Knofler M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol.* 54:269-280.
112. Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK. Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. *Exp Cell Res.* 1993;206:204-211.
113. Choy MY, Manyonda IT. The phagocytic activity of human first trimester extravillous trophoblast. *Hum Reprod.* 1998;13:2941-2949.
114. Cartwright JE, Kenny LC, Dash PR, Crocker IP, Aplin JD, Baker PN, Whitley GS. Trophoblast invasion of spiral arteries: a novel in vitro model. *Placenta.* 2002;23:232-235.
115. Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom JC. Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;195:29-39.
116. Heazell AE, Crocker IP. Live and let die - regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies. *Placenta.* 2008;29:772-783.
117. Zhang B, Zhou Z, Lin H, Lv X, Fu J, Lin P, Zhu C, Wang H. Protein phosphatase 1A (PPM1A) is involved in human cytotrophoblast cell invasion and migration. *Histochem Cell Biol.* 2009;132:169-179.
118. Lyall F. Mechanisms regulating cytotrophoblast invasion in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006;46:266-273.
119. Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest.* 1993;91:950-960.
120. Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, McMaster M, Bass K, Chun SH, Fisher SJ. Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *Am J Pathol.* 1997;151:1809-1818.
121. McMaster MT, Librach CL, Zhou Y, Lim KH, Janatpour MJ, DeMars R, Kovats S, Damsky C, Fisher SJ. Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts. *J Immunol.* 1995;154:3771-3778.
122. Koletsky S, Rivera-Velez JM, Pritchard WH. Production of hypertension and vascular disease by angiotensin. *Arch Pathol.* 1966;82:99-106.
123. Lombardi D, Gordon KL, Polinsky P, Suga S, Schwartz SM, Johnson RJ. Salt-sensitive hypertension develops after short-term exposure to Angiotensin II. *Hypertension.* 1999;33:1013-1019.
124. Shibata E, Powers RW, Rajakumar A, von Versen-Hoyneck F, Gallaher MJ, Lykins DL, Roberts JM, Hubel CA. Angiotensin II decreases system A amino

- acid transporter activity in human placental villous fragments through AT1 receptor activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291:E1009-1016.
125. Ahn KO, Lim SW, Li C, Yang HJ, Ghee JY, Kim JY, Kim SH, Kim J, Yang CW. Influence of angiotensin II on expression of toll-like receptor 2 and maturation of dendritic cells in chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation.* 2007;83:938-947.
126. Stec DE, Vera T, McLemore GR, Jr., Kelsen S, Rimoldi JM, Gadepalli RS, Ryan MJ. Heme oxygenase-1 induction does not improve vascular relaxation in angiotensin II hypertensive mice. *Am J Hypertens.* 2008;21:189-193.
127. Golledge J, Cullen B, Rush C, Moran CS, Secomb E, Wood F, Daugherty A, Campbell JH, Norman PE. Peroxisome proliferator-activated receptor ligands reduce aortic dilatation in a mouse model of aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* 210:51-56.
128. Daneshvar H, Edwards T, Voss K, Landis K, Gleason T, Atterson P. Cardiovascular assessment in radiotelemetry-implanted pregnant rats. *J Invest Surg.* 24:35-43.
129. Danser AH, Koning MM, Admiraal PJ, Derkx FH, Verdouw PD, Schalekamp MA. Metabolism of angiotensin I by different tissues in the intact animal. *Am J Physiol.* 1992;263:H418-428.
130. Beckstead JH. A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem.* 1994;42:1127-1134.
131. Jankowski V, Vanholder R, van der Giet M, Tolle M, Karadogan S, Gobom J, Furkert J, Oksche A, Krause E, Tran TN, Tepel M, Schuchardt M, Schluter H, Wiedon A, Beyermann M, Bader M, Todiras M, Zidek W, Jankowski J. Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:297-302.
132. Araki-Taguchi M, Nomura S, Ino K, Sumigama S, Yamamoto E, Kotani-Ito T, Hayakawa H, Kajiyama H, Shibata K, Itakura A, Kikkawa F. Angiotensin II mimics the hypoxic effect on regulating trophoblast proliferation and differentiation in human placental explant cultures. *Life Sci.* 2008;82:59-67.
133. Cartwright JE, Holden DP, Whitley GS. Hepatocyte growth factor regulates human trophoblast motility and invasion: a role for nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1999;128:181-189.
134. McCormick J, Whitley GS, Le Bouteiller P, Cartwright JE. Soluble HLA-G regulates motility and invasion of the trophoblast-derived cell line SGHPL-4. *Hum Reprod.* 2009;24:1339-1345.
135. Nehls V, Drenckhahn D. A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvasc Res.* 1995;50:311-322.
136. Dash PR, McCormick J, Thomson MJ, Johnstone AP, Cartwright JE, Whitley GS. Fas ligand-induced apoptosis is regulated by nitric oxide through the inhibition of fas receptor clustering and the nitrosylation of protein kinase Cepsilon. *Exp Cell Res.* 2007;313:3421-3431.
137. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995;4:357-362.
138. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 1992;10:413-417.

139. Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:8790-8794.
140. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*. 1999;75:291-295.
141. Eckert HG, Strecker H. [Principle and use of the radioimmunoassay]. *Naturwissenschaften*. 1978;65:245-249.
142. Chappell MC, Millsted A, Diz DI, Brosnihan KB, Ferrario CM. Evidence for an intrinsic angiotensin system in the canine pancreas. *J Hypertens*. 1991;9:751-759.
143. Allred AJ, Chappell MC, Ferrario CM, Diz DI. Differential actions of renal ischemic injury on the intrarenal angiotensin system. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;279:F636-645.
144. Geusens N, Hering L, Verlohren S, Luyten C, Drijkoningen K, Taube M, Vercruysse L, Hanssens M, Dechend R, Pijnenborg R. Changes in endovascular trophoblast invasion and spiral artery remodelling at term in a transgenic preeclamptic rat model. *Placenta*. 31:320-326.
145. Kam EP, Gardner L, Loke YW, King A. The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries. *Hum Reprod*. 1999;14:2131-2138.
146. Zenclussen AC, Fest S, Joachim R, Klapp BF, Arck PC. Introducing a mouse model for pre-eclampsia: adoptive transfer of activated Th1 cells leads to pre-eclampsia-like symptoms exclusively in pregnant mice. *Eur J Immunol*. 2004;34:377-387.
147. Dixon JS, Bulmer D. The fine structure of cells in the rat metrial gland. *J Anat*. 1971;108:123-133.
148. Quiroz Y, Bravo J, Herrera-Acosta J, Johnson RJ, Rodriguez-Iturbe B. Apoptosis and NFkappaB activation are simultaneously induced in renal tubulointerstitium in experimental hypertension. *Kidney Int Suppl*. 2003:S27-32.
149. Marques FZ, Pringle KG, Conquest A, Hirst JJ, Markus MA, Sarris M, Zakar T, Morris BJ, Lumbers ER. Molecular characterization of renin-angiotensin system components in human intrauterine tissues and fetal membranes from vaginal delivery and cesarean section. *Placenta*. 32:214-221.
150. Levy A, Yagil Y, Bursztyn M, Barkalifa R, Scharf S, Yagil C. ACE2 expression and activity are enhanced during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R1953-1961.
151. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med*. 2006;354:1387-1401.
152. Zhai XY, Nielsen R, Birn H, Drumm K, Mildenberger S, Freudinger R, Moestrup SK, Verroust PJ, Christensen EI, Gekle M. Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney. *Kidney Int*. 2000;58:1523-1533.
153. Zoja C, Benigni A, Remuzzi G. Protein overload activates proximal tubular cells to release vasoactive and inflammatory mediators. *Exp Nephrol*. 1999;7:420-428.
154. Nauta FL, Boertien WE, Bakker SJ, van Goor H, van Oeveren W, de Jong PE, Bilo H, Gansevoort RT. Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes. *Diabetes Care*. 34:975-981.

155. Decavele AS, Dhondt L, De Buyzere ML, Delanghe JR. Increased urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin in urinary tract infections and leukocyturia. *Clin Chem Lab Med*.49:999-1003.
156. Zou LX, Hymel A, Imig JD, Navar LG. Renal accumulation of circulating angiotensin II in angiotensin II-infused rats. *Hypertension*. 1996;27:658-662.
157. Aljabri MB, Songstad NT, Lund T, Serrano MC, Andreasen TV, Al-Saad S, Lindal S, Sitras V, Acharya G, Ytrehus K. Pregnancy protects against antiangiogenic and fibrogenic effects of angiotensin II in rat hearts. *Acta Physiol (Oxf)*.201:445-456.
158. Gutkowska J, Granger JP, Lamarca BB, Danalache BA, Wang D, Jankowski M. Changes in cardiac structure in hypertension produced by placental ischemia in pregnant rats: effect of tumor necrosis factor blockade. *J Hypertens*.
159. Eskild A, Vatten LJ. Do pregnancies with pre-eclampsia have smaller placentas? A population study of 317 688 pregnancies with and without growth restriction in the offspring. *Bjog*.117:1521-1526.
160. Staff AC, Dechend R, Pijnenborg R. Learning from the placenta: acute atherosclerosis and vascular remodeling in preeclampsia-novel aspects for atherosclerosis and future cardiovascular health. *Hypertension*.56:1026-1034.
161. Schmidt-Ott KM, Kagiya S, Phillips MI. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Regul Pept*. 2000;93:65-77.
162. Wladimiroff JW, Tonge HM, Stewart PA. Doppler ultrasound assessment of cerebral blood flow in the human fetus. *Br J Obstet Gynaecol*. 1986;93:471-475.
163. Roza SJ, Steegers EA, Verburg BO, Jaddoe VW, Moll HA, Hofman A, Verhulst FC, Tiemeier H. What is spared by fetal brain-sparing? Fetal circulatory redistribution and behavioral problems in the general population. *Am J Epidemiol*. 2008;168:1145-1152.
164. Kajantie E, Eriksson JG, Osmond C, Thornburg K, Barker DJ. Pre-eclampsia is associated with increased risk of stroke in the adult offspring: the Helsinki birth cohort study. *Stroke*. 2009;40:1176-1180.
165. Baschat AA. Fetal responses to placental insufficiency: an update. *Bjog*. 2004;111:1031-1041.
166. Napolitano PG, Hoeldtke NJ, Moore KH, Calhoun BC, Christensen ED, Markenson GR, Hume RF, Jr. The fetoplacental pressor effects of low-dose acetylsalicylic acid and angiotensin II in the ex vivo cotyledon model. *Am J Obstet Gynecol*. 1997;177:1093-1096.
167. Bohlender J, Fukamizu A, Lippoldt A, Nomura T, Dietz R, Menard J, Murakami K, Luft FC, Ganten D. High human renin hypertension in transgenic rats. *Hypertension*. 1997;29:428-434.
168. Mervaala E, Muller DN, Schmidt F, Park JK, Gross V, Bader M, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC. Blood pressure-independent effects in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension*. 2000;35:587-594.
169. Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med*. 2001;79:76-102.
170. Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *Bmj*. 1995;311:171-174.
171. Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med*. 2007;261:412-417.
172. Verlohren S, Geusens N, Morton J, Verhaegen I, Hering L, Herse F, Dudenhausen JW, Muller DN, Luft FC, Cartwright JE, Davidge ST, Pijnenborg

- R, Dechend R. Inhibition of trophoblast-induced spiral artery remodeling reduces placental perfusion in rat pregnancy. *Hypertension*.56:304-310.
173. Arenas IA, Xu Y, Lopez-Jaramillo P, Davidge ST. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286:C779-784.
174. Wang M, Zhang J, Spinetti G, Jiang LQ, Monticone R, Zhao D, Cheng L, Krawczyk M, Talan M, Pintus G, Lakatta EG. Angiotensin II activates matrix metalloproteinase type II and mimics age-associated carotid arterial remodeling in young rats. *Am J Pathol*. 2005;167:1429-1442.
175. DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am J Pathol*. 1999;155:293-301.
176. Kadyrov M, Schmitz C, Black S, Kaufmann P, Huppertz B. Pre-eclampsia and maternal anaemia display reduced apoptosis and opposite invasive phenotypes of extravillous trophoblast. *Placenta*. 2003;24:540-548.
177. Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre-eclampsia. *Lancet*.376:631-644.
178. Bass KE, Morrish D, Roth I, Bhardwaj D, Taylor R, Zhou Y, Fisher SJ. Human cytotrophoblast invasion is up-regulated by epidermal growth factor: evidence that paracrine factors modify this process. *Dev Biol*. 1994;164:550-561.
179. Librach CL, Feigenbaum SL, Bass KE, Cui TY, Verastas N, Sadovsky Y, Quigley JP, French DL, Fisher SJ. Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *J Biol Chem*. 1994;269:17125-17131.
180. Mates L, Chuah MK, Belay E, Jerchow B, Manoj N, Acosta-Sanchez A, Grzela DP, Schmitt A, Becker K, Matrai J, Ma L, Samara-Kuko E, Gysemans C, Pryputniewicz D, Miskey C, Fletcher B, VandenDriessche T, Ivics Z, Izsvak Z. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet*. 2009;41:753-761.
181. Constanica M, Hemberger M, Hughes J, Dean W, Ferguson-Smith A, Fundele R, Stewart F, Kelsey G, Fowden A, Sibley C, Reik W. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature*. 2002;417:945-948.
182. Sibley CP, Coan PM, Ferguson-Smith AC, Dean W, Hughes J, Smith P, Reik W, Burton GJ, Fowden AL, Constanica M. Placental-specific insulin-like growth factor 2 (Igf2) regulates the diffusional exchange characteristics of the mouse placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:8204-8208.
183. Kvehaugen AS, Dechend R, Ramstad HB, Troisi R, Fugelseth D, Staff AC. Endothelial function and circulating biomarkers are disturbed in women and children after preeclampsia. *Hypertension*.58:63-69.
184. Young B, Hacker MR, Rana S. Physicians' Knowledge of Future Vascular Disease in Women with Preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*.
185. Besler C, Doerries C, Giannotti G, Luscher TF, Landmesser U. Pharmacological approaches to improve endothelial repair mechanisms. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2008;6:1071-1082.
186. Fischer R, Dechend R, Qadri F, Markovic M, Feldt S, Herse F, Park JK, Gapelyuk A, Schwarz I, Zacharzowsky UB, Plehm R, Safak E, Heuser A, Schirdewan A, Luft FC, Schunck WH, Muller DN. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and direct renin inhibition improve electrical remodeling in a model of high human renin hypertension. *Hypertension*. 2008;51:540-546.

187. Poston L. Endothelial dysfunction in pre-eclampsia. *Pharmacol Rep.* 2006;58 Suppl:69-74.
188. Hunig T, Dennehy K. CD28 superagonists: mode of action and therapeutic potential. *Immunol Lett.* 2005;100:21-28.
189. Kvakan H, Kleinewietfeld M, Qadri F, Park JK, Fischer R, Schwarz I, Rahn HP, Plehm R, Wellner M, Elitok S, Gratze P, Dechend R, Luft FC, Muller DN. Regulatory T cells ameliorate angiotensin II-induced cardiac damage. *Circulation.* 2009;119:2904-2912.
190. Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, Shiozaki A, Rolinski J, Saito S. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol.* 2007;149:139-145.
191. Redman CW, Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 63:534-543.

Doktorarbeit Nele Geusens, Leuven, Belgien, 2010: Trophoblast invasion in rat models for preeclampsia

Doktorarbeit Florian Herse, Berlin, Deutschland, 2007: Die Bedeutung des lokalen und zirkulierenden Renin-Angiotensin Systems bei Präeklampsie



## **10 Danksagung**

An allererster Stelle möchte ich mich bei Professor Thomas Börner bedanken, der nicht nur die offizielle Betreuung dieser Doktorarbeit an der Humboldt-Universität zu Berlin übernommen hat, sondern bereits während des Studiums mein Lehrer und Prüfer war.

Meinen Mentoren Privatdozent Ralf Dechend und Professor Dominik N. Müller danke ich sehr für die Überlassung dieses komplexen und interessanten Themas. Ihre Begeisterung für die Wissenschaft, ihre Förderung meiner Eigenständigkeit und ihr Optimismus bei Rückschlägen waren Hilfe und Ansporn für mich. Sie haben mir viele produktive Kooperationen ermöglicht und mich in die Welt der Kongresse eingeführt.

Ein besonders herzlicher Dank geht an Doktor Florian Herse, der mich von meinem ersten Tag im Labor an in jeder Situation unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte. Ohne ihn wäre der Alltag in Labor und Büro sehr grau gewesen.

Doktor Judith Cartwright danke ich für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die produktiven Diskussionen und die wundervollen Tips zur Freizeitgestaltung in London. Die Zusammenarbeit mit Doktor Nele Geusens verlief sehr produktiv und ich habe die gemeinsame Zeit in Leuven sehr genossen. Auch bei Professor Berthold Huppertz, Professor Bridget Brosnihan, Professor Wolfgang Schneider und Professor Robert Pijnenborg bedanke ich mich ganz herzlich für ihre Kooperationsbereitschaft und die vielen wertvollen Ratschläge.

Bei Boehringer Ingelheim Fonds bedanke ich mich ganz herzlich für die Zuerkennung des Travel Allowance, der mir die Mitarbeit im Labor von Dr. Cartwright in London ermöglicht hat.

Ulrike, Sandra, Claudia, Basti, Lajos und Andrei, es hat viel Spass gemacht, mit Euch zusammen zu arbeiten.

Ein besonderer Dank geht an Doktor Maren Wellner, Doktor Fatimunnisa Qadri, Doktor Jürgen Janke, Doktor Andreas Busjahn und Doktor Harald Heidecke.

Für exzellente technische Assistenz möchte ich mich bei Reika Langanki, Ralph Plehm, Jutta Meisel, Monique Bergemann, Jana Czychi, Gabi N'diaye, Juliane

Anders und Irene Strauss bedanken. May-Britt Köhler danke ich ganz herzlich für die weit über technische Assistenz hinausgehende „Goldstaub“ Unterstützung.

Ich danke den Gutachtern, dem Promotionsausschuss und all den anderen, die zum erfolgreichen Abschluss meiner Dissertation beigetragen haben.

Unabhängig vom Laboralltag möchte ich meiner Familie, besonders Marcel und Nora, für die liebevolle Unterstützung danken. Einen Kuss für das tollste Kind der Welt!

## **11 Publikationsliste**

### **11.1 Paper**

Wenzel K, Rajakumar A, Haase H, Geusens N, Hubner N, Schulz H, Brewer J, Roberts L, Hubel CA, Herse F, **Hering L**, Qadri F, Lindschau C, Wallukat G, Pijnenborg R, Heidecke H, Riemekasten G, Luft FC, Muller DN, Lamarca B, Dechend R. Angiotensin II Type 1 Receptor Antibodies and Increased Angiotensin II Sensitivity in Pregnant Rats. Hypertension. 2011 Jul;58(1):77-84

Verlohren S, Geusens N, Morton J, Verhaegen I, **Hering L**, Herse F, Dudenhausen JW, Muller DN, Luft FC, Cartwright JE, Davidge ST, Pijnenborg R, Dechend R. Inhibition of trophoblast-induced spiral artery remodelling reduces placental perfusion in rat pregnancy. Hypertension. 2010 Aug;56(2):304-10

**Hering L**<sup>\*</sup>, Herse F<sup>\*</sup>, Geusens N, Verlohren S, Wenzel K, Staff AC, Brosnihan KB, Huppertz B, Luft FC, Muller DN, Pijnenborg R, Cartwright JE, Dechend R. Effects of circulating and local uteroplacental angiotensin II in rat pregnancy. Hypertension. 2010 Aug;56(2):311-8

Geusens N, **Hering L**, Verlohren S, Luyten C, Drijkoningen K, Taube M, Vercruysse L, Hanssens M, Dechend R, Pijnenborg R. Changes in endovascular trophoblast invasion and spiral artery remodelling at term in a transgenic preeclamptic rat model. Placenta. 2010 Apr;31(4):320-6

Brosnihan KB, **Hering L**, Dechend R, Chappell MC, Herse F. Increased angiotensin II in the mesometrial triangle of a transgenic rat model of preeclampsia. Hypertension. 2010 Feb;55(2):562-6

Geusens N, Verlohren S, Luyten, C, Taube M, **Hering L**, Vercruysse L, Hanssens M, Dudenhausen J, Dechend R, Pijnenborg R. Endovascular trophoblast invasion, spiral artery remodelling and uteroplacental haemodynamics in a transgenic rat model of pre-eclampsia. Placenta. 2008 Jul;29(7):614-23

Herse F, Staff AC, **Hering L**, Muller DN, Luft FC, Dechend R. AT1-Receptor Autoantibodies and Uteroplacental RAS in pregnancy and preeclampsia. J Mol Med. 2008 Jun;86(6):697-703

**Hering L\***, Herse F\*, Verlohren S\*, Park JK, Wellner M, Qadri F, Pijnenborg R, Staff AC, Huppertz B, Muller DN, Luft FC, Dechend R. Trophoblasts Reduce the Vascular Smooth Muscle Cell Proatherogenic Response. Hypertension 2008 Feb;51(2):554-9

Verlohren S\*, Niehoff M\*, **Hering L\***, Geusens N, Herse F, Tintu AN, Plagemann A, LeNoble F, Pijnenborg R, Muller DN, Luft FC, Dudenhausen JW, Gollasch M, Dechend R. Uterine vascular function in a transgenic preeclampsia rat model. Hypertension 2008 Feb;51(2):547-53

Herse F, Dechend R, Harsem NK, Wallukat G, Janke J, Qadri F, **Hering L**, Muller DN, Luft FC, Staff AC. Dysregulation of the Circulating and Tissue-Based Renin-Angiotensin System in Preeclampsia. Hypertension 2007 Mar;49(3):604-11

\* Entsprechende Autoren haben gleichberechtigt zur Publikation beigetragen.

## 11.2 Aktive Beiträge auf Kongressen

Posterpräsentation auf dem Kongress der International Federation of Placenta Associations IFPA 2007 in Kingston, Kanada, Loke Travel Award

Vortrag auf dem Kongress der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL 2007 in Bochum, Young Investigator Award

Posterpräsentation auf dem 9. MDC/FMP PhD Student Retreat in Joachimsthal, Deutschland

Posterpräsentation auf dem Kongress der International Federation of Placenta Associations IFPA 2008 in Graz, Österreich

Vortrag auf dem Deutschen Gestose-Kongress 2009 in Jena, Deutschland

**12 Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, Lydia Hering, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig erarbeitet und verfasst sowie keine anderen als die angegebenen Hilfen und Hilfsmittel verwendet habe.